

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Herstellung eines Knockin Mausmodells mit veränderter
Modulation des HCN2-Ionenkanals**

von

Christian Gruner

aus Neuhaus am Rennweg

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 08.12.2011

.....
Christian Gruner

Dissertation eingereicht am 16.12.2011

1. Gutachter Prof. Dr. C. Wahl-Schott

2. Gutachter Prof. Dr. M. Biel

mündliche Prüfung am 11.01.2012

INHALTSVERZEICHNIS

	INHALTSVERZEICHNIS	I
	ABKÜRZUNGEN	V
1	EINLEITUNG	1
1.1	Der I_h	1
1.2	Die HCN-Kanäle	2
1.2.1	Aufbau der HCN-Ionenkanäle	2
1.2.2	Aktivierung und Koaktivierung der HCN-Kanäle	5
1.3	Die physiologische Rolle der HCN-Kanäle	6
1.3.1	cAMP abhängige Modulation des I_h im Sinusknoten	6
1.3.2	cAMP abhängige Modulation des I_h in Neuronen	8
1.4	Zielsetzung der Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer und Kunststoffwaren	12
2.2	Arbeiten mit DNA	12
2.2.1	Amplifikation von DNA	12
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	12
2.2.1.2	Primer	13
2.2.1.3	Template	13
2.2.1.4	Standard Phusion PCR-Ansatz	13
2.2.1.5	Gezielte Mutagenese	14
2.2.2	Enzymatische Modifikation von DNA	14
2.2.2.1	Restriktionsverdau	14
2.2.2.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	15
2.2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten	15
2.2.3	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	16
2.2.4	Aufreinigung von DNA	17
2.2.4.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	17
2.2.4.2	Ethanol-Natriumacetat Präzipitation von DNA	18
2.2.4.3	Aufreinigung mittels Silicasäulen	18
2.2.5	Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA	18
2.2.5.1	Verwendete Plasmide	18

2.2.5.2	Transformation und Kultur von <i>E. coli</i> -Bakterien	19
2.2.5.3	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)	19
2.2.5.4	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)	21
2.2.5.5	Quantifizierung von DNA	21
2.2.6	Sequenzierung von DNA	21
2.2.7	Generierung von Klonierungsvektoren mit individueller MCS	21
2.2.8	Southern Blot	22
2.2.8.1	Verdau von genomischer ES-Zell DNA	23
2.2.8.2	Gelelektrophorese von DNA	23
2.2.8.3	Transfer der DNA auf Membranen (Blotting Verfahren)	24
2.2.8.4	Herstellung einer ³² P markierten DNA-Sonde	25
2.2.8.5	Aufreinigung der DNA-Sonde mittels Größenausschluss-Chromatographie	26
2.2.8.6	Prähybridisieren von Southern Blot Membranen	26
2.2.8.7	Hybridisieren von Southern Blot Membranen	27
2.2.8.8	Waschen von Southern Blot Membranen	27
2.2.8.9	Auswertung von Southern Blot Membranen	27
2.2.8.10	Verwendete Lösungen	28
2.3	Gentargeting muriner embryonaler Stammzellen	29
2.3.1	Vorbereitung des Targetingvektors zur Elektroporation	30
2.3.2	Elektroporation des Targetingvektors in murine ES-Zellen	30
2.3.3	Picken und die Kultur von ES-Zellklonen	31
2.3.4	Einfrieren von ES-Zellen	31
2.3.5	Lyse von ES-Zellen und Präparation von ES-Zell DNA	32
2.4	Biopsie und Gewebeverdau	34
2.5	Standardgenotypisierungsansatz für die PCR	34

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Funktionelle Untersuchung von cAMP insensitive HCN2-Kanalmutanten	36
3.2	Generierung einer Knockin Mauslinie	38
3.2.1	Planung des Targetingkonstrukts	39
3.2.1.1	ACN-Kassette	39
3.2.1.2	Planung der Southern Blot Strategien	40
3.2.2	Test der Southern Blot Strategien	42
3.2.2.1	Test der Strategie für den 3'-Bereich	42
3.2.2.2	Test der Strategie für den 5'-Bereich	43
3.2.2.3	Test der Strategie zur Prüfung auf Mehrfachintegration	44
3.2.3	Klonierung des Targetingkonstrukts	46
3.2.3.1	Klonierung von Vektoren mit individueller MCS	47
3.2.3.2	Klonierung des 3'-Bereichs	48
3.2.3.3	Klonierung des 5'-Bereichs	50
3.2.3.4	Klonierung der ACN-Kassette	53
3.2.4	Analyse des Targetingkonstrukts	54
3.2.5	Vorbereitung des Targetingvektors zur Elektroporation	55
3.2.6	Gewinnung der ES-Zellen und Extraktion der DNA	55
3.2.7	Analyse der ES-Zell DNA	56
3.2.7.1	Sequenzanalyse der ES-Zell DNA	56
3.2.7.2	Southern Blot Analyse zur Prüfung der Rekombination im 3'-Bereich	58
3.2.7.3	Southern Blot Analyse zur Prüfung der Rekombination im 5'-Bereich	60
3.2.7.4	Southern Blot Analyse zur Prüfung auf Mehrfachintegration	61
3.2.7.5	Sequenzanalyse der 5'- und der 3'- Übergänge nach der Rekombination	63
3.2.8	Blastozysteninjektion von ES-Zellen	63
3.2.9	Genotypisierungsstrategie	64

4	DISKUSSION	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	69
6	ANHANG	71
6.1	Verwendete Primer	71
6.2	Sequenz des Targetingvektors	74
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	PUBLIKATIONEN	84
9	DANKSAGUNG	85
10	LEBENS LAUF	87

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A	Alanin
α	alpha
<i>ad</i>	zu
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	$\alpha^{32}\text{P}$ markiertes Desoxycytidintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
ca.	zirka (<i>circa</i>)
Ca^{2+}	Calciumionen
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CIP	alkalische Phosphatase aus dem Kälbermagen (<i>calf intestine phosphatase</i>)
cm	Zentimeter
CNBD	zyklische Nukleotide bindende Domäne (<i>cyclic nucleotide binding domain</i>)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cpm	Impulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CT	<i>crista terminalis</i>
d	Tag
DD	diastolische Depolarisation
depol.	depolarisierende
dDTP	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dTTP)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	embryonale Stammzellen
et al.	und Kollegen
F	Phenylalanin
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
G	Guanin
G	Glycin
g	Gramm
g	g-Kraft
GABA	gamma-Aminobuttersäure
G 418	Geneticin
h	Stunde(n)
HCN	<i>hyperpolarization cyclic nucleotide-gated</i>
HEK 293	menschliche embryonale Niere 293 (<i>human embryonic kidney 293</i>)
H ₂ O	Wasser
I	Stromstärke
I _h	hyperpolarisationsaktivierter Strom
I _T	Strom durch T-Typ Calciumkanäle
K ⁺	Kaliumionen
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Knockin
l	Liter
LB(+)	Luria-Bertani (mit Glukose)
LIF	Leukämie inhibierender Faktor (<i>leukemia inhibitory factor</i>)
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase (<i>locus of x-over of P1</i>)
M	mol pro Liter
MBq	Megabecquerel
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>mutiple clonig site</i>)
max.	maximal(e)
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)

mJ	Millijoule
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol pro Liter
MPI	Max-Planck-Institut
ms	Millisekunde(n)
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
mV	Millivolt
n	Anzahl
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	<i>New England Biolabs</i>
ng	Nanogramm
Neo	Neomycinresistenzgen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
³² P	Isotop des Phosphors mit der Massenzahl 32
pA	Pikoampere
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pBS	pBlueskript II SK / KS (+) Vektor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert
Pho	Phosphatgruppe
pmol	Pikomol
Puffer (GC)	Puffer für GC-reiche Templates
qs	so viel wie nötig (<i>quantum satis</i>)
R	Arginin
R 5′	Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen am 5′-Ende
R 3′	Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen am 3′-Ende
REM	schnelle Augenbewegungen (<i>rapid eye movement</i>)

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Segment(e)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK	Sinusknoten
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismen (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSC	Natriumcitrat Salzlösung (<i>saline sodium citrate (buffer)</i>)
T	Thymin
T	Threonin
T	Temperatur
T4	T4-Phage
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	nicht translatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
V	Spannung in Volt
V	Valin
V	Volt
V _{0,5}	halbmaximale Aktivierung
VSD	Spannungssensordomäne (<i>voltage sensing domain</i>)
WT	Wildtyp
x	fach
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
∞	unendlich

1. EINLEITUNG

Ionenkanäle gehören zur Gruppe der transmembranären Proteine. Sie ermöglichen den Fluss von Ionen wie Natrium, Kalium, Calcium oder Chlorid durch biologische Membranen. Ionenkanäle spielen eine zentrale Rolle bei der Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen, bei der Erregungsbildung und -leitung in Nervenzellen, bei der Muskelkontraktion und einer Vielzahl von weiteren physiologischen Prozessen.

1.1 Der I_h

Ende der 70 er Jahre wurde ein Strom an Sinusknotenzellen (Brown et al. 1979a; Brown et al. 1977; Noma 1976) und Neuronen (Fain et al. 1978; Halliwell and Adams 1982) entdeckt, der durch K^+ und Na^+ getragen und bei Membranhypervolarisation aktiviert wird. Dieser Strom wird als I_h (h = „*hyperpolarisation*“) bezeichnet. Weitere Bezeichnungen für diesen Strom sind I_f (f = „*funny*“) (Brown et al. 1979a) und I_q (q = „*queer*“) (Halliwell and Adams 1982). Ein Kennzeichen dieses Stroms ist, dass der I_h durch direkte Interaktion mit Zyklonukleotiden, unabhängig von Phosphorylierungsreaktionen, verstärkt wird (DiFrancesco 1993) (Abbildung 3).

Der I_h ist von zentraler Bedeutung für die Entstehung des autonomen Herzschlages, weshalb der I_h auch als Schrittmacherstrom bezeichnet wird (Abbildung 4). Der I_h spielt zudem eine wichtige Rolle bei Prozessen im zentralen Nervensystem wie der dendritischen Integration (Magee 1998; Magee 1999; Williams and Stuart 2000), der Bildung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses (Wang et al. 2007), dem Erlernen motorischer Prozesse (Nolan et al. 2003), der Steuerung der Langzeit-Potenzierung im Hippocampus (Nolan et al. 2004; Tsay et al. 2007), der Neurotransmission (Huang et al. 2011) und bei verschiedenen Resonanz- und Oszillationsprozessen (Biel et al. 2009). Darüber hinaus ist der I_h essentiell für die rhythmische Aktivität neuronaler Schaltkreise im Gehirn, wie beispielsweise der thalamischen Oszillation (Abbildung 6) und ist in diesem Zusammenhang an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt (Biel et al. 2009).

1.2 Die HCN-Kanäle

Erst 20 Jahre nach der Entdeckung des I_h konnten die HCN-Ionenkanäle, die diesem Strom zu Grunde liegen, in Neuronen und Sinusknotenzellen identifiziert und kloniert werden (Gauss et al. 1998; Ludwig et al. 1998; Ludwig et al. 1999; Santoro et al. 1998).

HCN-Kanäle („*hyperpolarization cyclic nucleotide-gated (channels)*“) gehören zur Superfamilie der spannungsgesteuerten Kationenkanäle. Sie werden durch Hyperpolarisation aktiviert und durch Zyklonukleotide gesteuert. Dieser Vorgang wird auch als „*Dual Gating*“ bezeichnet. Sie stellen eine kleine Proteinfamilie mit vier Mitgliedern (HCN1-HCN4) dar (Ludwig et al. 1998; Santoro et al. 1998).

1.2.1 Aufbau der HCN-Ionenkanäle

Die HCN-Kanäle können als Homotetramere oder auch Heterotetramere der Untereinheiten HCN1-4 vorliegen (Much et al. 2003). Jede dieser Untereinheiten besteht aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten (S1-S6) sowie einem intrazellulär lokalisiertem N- und C-Terminus. Die sechs Transmembransegmente lassen sich in die Kernregion (S5-S6, „*Core*“) sowie die Spannungssensordomäne (S1-S4, „*voltage sensing domain*“, VSD) unterteilen. Im C-Terminus der HCN-Kanaluntereinheiten ist die Zyklonukleotid-Bindungsdomäne („*cyclic nucleotide binding domain*“, CNBD) lokalisiert (Abbildung 1).

Die Kernregion wird aus den Transmembransegmenten (S5-S6) gebildet, welche sich um die Pore anordnen (Biel et al. 2009). An deren engster Stelle befindet sich der sogenannte Selektivitätsfilter mit dem Aminosäuremotiv G-Y-G (Glyzin-Tyrosin-Glyzin). Dieses Motiv findet man auch im hoch konservierten Selektivitätsfilter T-V-G-Y-G (Threonin-Valin-Glyzin-Tyrosin-Glyzin) von Kaliumkanälen (Doyle et al. 1998). Es ist ungeklärt, welche molekularen Determinanten es den HCN-Kanälen ermöglichen, trotz des ähnlichen Selektivitätsfilters unter physiologischen Bedingungen Na^+ zu leiten.

Der Verschlussmechanismus des Kanals wird durch das S6 Segment gebildet. Analog zu Kaliumkanälen befindet sich in diesem Segment die Aminosäure Glyzin (Position 433 im HCN2-Kanal). Diese Aminosäure fungiert an dieser Stelle ähnlich wie ein Scharnier. An diesem Scharnier kann das S6-Segment eine Konformationsänderung erfahren und kann so zum Öffnen oder zum Verschluss der Pore führen. Das sogenannte „*Gate*“ wird durch den

unteren Teil des S6-Segments, distal des Scharniers, gebildet. Das Öffnen und Schließen der Pore und die Steuerung des Prozesses wird als „Gating“ bezeichnet.

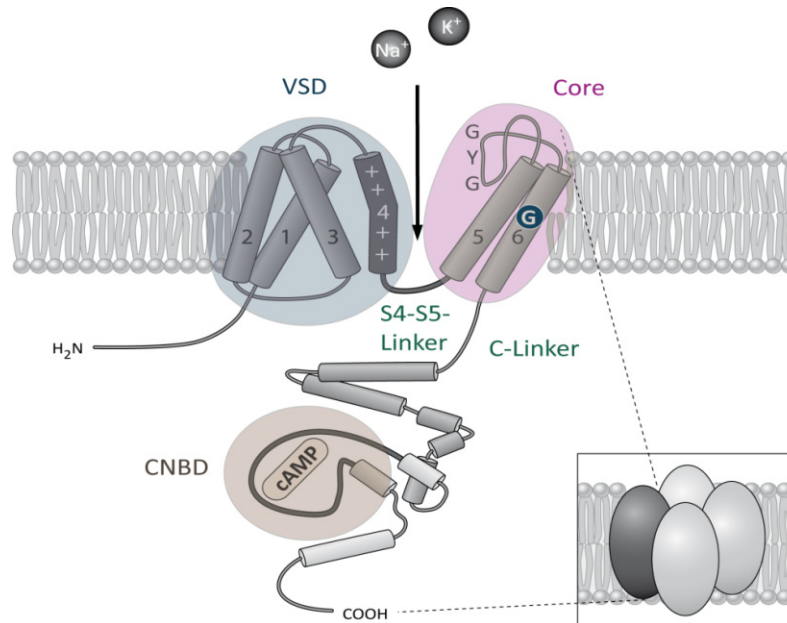


Abbildung 1: Der schematische Aufbau einer HCN-Kanal Untereinheit. Ein HCN-Kanal wird aus vier Untereinheiten gebildet, welche sich symmetrisch um die Pore assemblieren und dabei Homo- und Heterotetramere bilden können. Eine Untereinheit besteht aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten (S1-S6) sowie einem zytosolisch gelegenen N- und C-Terminus. Die sechs Transmembransegmente lassen sich in die Spannungssensordomäne (VSD, S1-S4) und die Kernregion („Core“, S5-S6), welche die Pore formt und in der sich der Selektivitätsfilter (G-Y-G) befindet, unterteilen. Im S6-Segment befindet sich die Aminosäure Glycin (G), die an dieser Stelle wie ein Scharnier fungiert. Der distal dieses Glycins befindliche Teil des S6-Segments bildet das sogenannte „Gate“. Die VSD und die Kernregion sind über den S4-S5-Linker miteinander verbunden. Die Zyklonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD) ist über den C-Linker mit den Transmembransegment S6 verbunden. (Modifiziert nach (Biel et al. 2009))

Als Spannungssensordomäne (VSD) der HCN-Kanäle dienen die Segmente S1-S4. Für die positive Ladung der VSD sind Aminosäuren wie Arginin bzw. Lysin im S4-Segment verantwortlich (Chen et al. 2000; Vaca et al. 2000). Positiv geladene S4-Helices lassen sich unter allen Vertretern der Superfamilie der spannungsabhängigen „Pore-Loop“-Kationenkanäle finden (Yu and Catterall 2004).

Spannungssensoren haben die Fähigkeit sich in der Membran, in Abhängigkeit von deren elektrischen Feld, auf bzw. ab zu bewegen. Die Hyperpolarisation der Membran (Membranspannung innen negativ) führt dazu, dass der positiv geladene Spannungssensor in

der Membran sich Richtung Zytosol bewegt und sich das *Gate* des HCN-Kanals öffnet. Bei Depolarisation (Membranspannung innen positiv) bewegt sich der Spannungssensor wieder in seine Ausgangsposition zurück und das *Gate* des Kanals schließt sich. Diese Bewegung der Spannungssensordomäne wird durch den S4-S5-Linker auf den Verschlussmechanismus im S6-Segment übertragen und führt so zum Öffnen oder Schließen des Kanals (Decher et al. 2004; Long et al. 2005; Prole and Yellen 2006). Dieser Vorgang funktioniert bei spannungsabhängigen Ionenkanälen, die bei Depolarisation öffnen, prinzipiell ähnlich. Ein Unterschied besteht bei diesen Kanälen in der Kopplung an das *Gate*. Dabei führt bei Hyperpolarisation die Bewegung des Spannungssensors Richtung Zytosol zum Schließen der Kanäle, bei einer Depolarisation hingegen öffnet die Bewegung des Spannungssensors den Kanal (Männikkö et al. 2002).

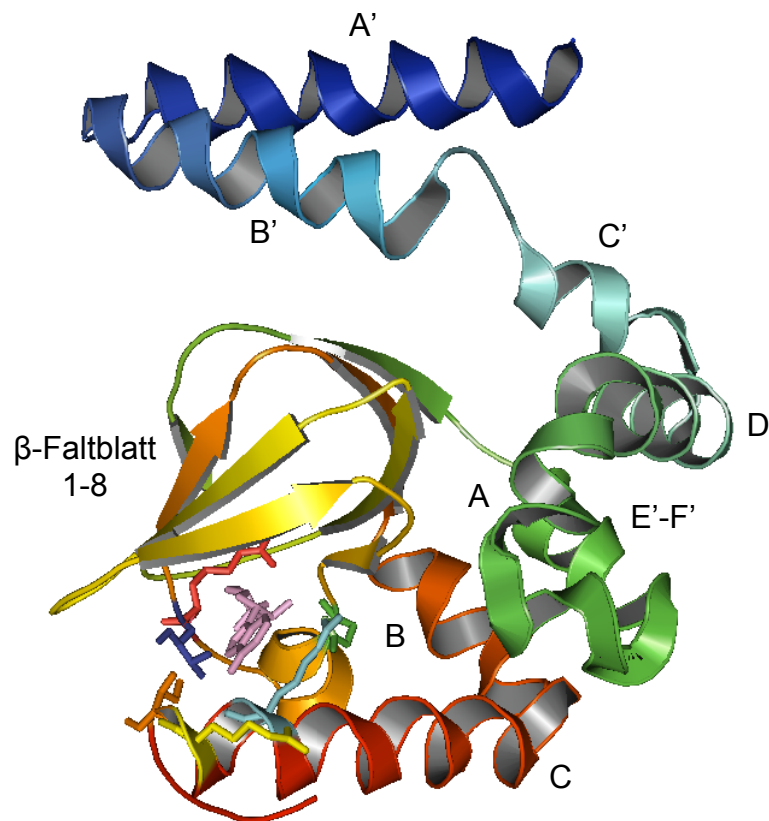


Abbildung 2: Kristallstruktur des C-Terminus des HCN2-Kanals. Gezeigt ist der C-Terminus des HCN2-Kanals, an dessen CNBD cAMP (pink) gebunden hat. Der C-Terminus besteht aus sechs α -Helices (A'-F'). Die CNBD besteht aus einer α -Helix (A-Helix, A) gefolgt von acht β -Faltblatt Domänen (β -Faltblatt 1-8) sowie zwei weiteren α -Helices, der B-Helix (B) und der C-Helix (C). Hervorgehoben sind die für die cAMP-Bindung wichtigen Aminosäuren: Glutaminsäure 582 (grün), Arginin 591 (rot), Threonin 592 (blau), Arginin 632 (cyan), Arginin 635 (gelb), Isoleucin 636 (orange) und Lysin 638 (schwarz). (Modifiziert nach (Zagotta et al. 2003))

HCN-Kanäle werden durch die Bindung von Zyklonukleotiden an die CNBD koaktiviert. Der C-Terminus des Kanals enthält die Zyklonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD) und den C-Linker, über den die CNBD mit dem S6-Segment verbunden ist. Der C-Linker besteht aus sechs α -Helices (A'-F'). Die CNBD besteht aus einer α -Helix (A-Helix) gefolgt von acht β -Faltblatt Domänen und zwei weiteren α -Helices, der B-Helix und C-Helix (Zagotta et al. 2003).

Innerhalb der CNBD sind verschiedene Aminosäuren der β -Faltblatt Domänen (z.B. beim HCN2-Kanal E582, R591 und T592) und der C-Helix (z.B. beim HCN2-Kanal R632, R635, I636 und K638) für die cAMP-Bindung besonders wichtig (Zhou and Siegelbaum 2007) (Abbildung 2). Die erwähnten Aminosäuren der C-Helix tragen außerdem zu einer höheren Selektivität der Bindungstasche für cAMP gegenüber cGMP bei. Dies erklärt die höhere Selektivität der Bindungstasche gegenüber cAMP im Vergleich zu cGMP jedoch nicht vollständig. Es gibt Evidenzen, dass die Selektivität auch aufgrund einer höheren Hydratationsenergie von cGMP im Vergleich zu cAMP zustande kommt. Dieser Umstand führt dazu, dass eine Bindung von cGMP gegenüber cAMP an den Kanal energetisch ungünstiger ist (Zhou and Siegelbaum 2008).

1.2.2 Aktivierung und Koaktivierung der HCN-Kanäle

Die vier Subtypen der HCN-Kanäle unterscheiden sich stark in ihren biophysikalischen Eigenschaften sowie in ihrer Koaktivierbarkeit durch cAMP (Ludwig et al. 1999; Seifert et al. 1999; Stieber et al. 2005). Der HCN2- sowie der HCN4-Kanal zeichnen sich durch eine hohe Affinität für cAMP aus. Für den HCN2-Kanal ist ein K_d -Wert von 0,5 μ M für cAMP und 6 μ M für cGMP beschrieben (Kusch et al. 2010; Ludwig et al. 1998). Die Aktivierungskurve dieser beiden Kanäle wird durch cAMP um 10-25 mV in Richtung positiverer Potentiale verschoben. Dieser Effekt fällt mit 2-7 mV beim HCN1-Kanal eher gering aus (Biel et al. 2009). Der HCN3-Kanal wird durch Zyklonukleotide nicht koaktiviert (Altomare et al. 2003; Santoro et al. 2000; Viscomi et al. 2001).

Die vier Subtypen unterscheiden sich auch in ihrer spannungsabhängigen Aktivierung. So werden der HCN2- und der HCN4-Kanal erst bei 20 mV negativeren Potentialen als der HCN1- und der HCN3-Kanal aktiviert. Auch hinsichtlich ihrer Aktivierungsgeschwindigkeiten unterscheiden sich die vier Subtypen stark, wobei der HCN1-Kanal am schnellsten, der HCN4-Kanal am langsamsten aktiviert wird. Die

Aktivierungsgeschwindigkeiten des HCN2- und HCN3-Kanals liegen zwischen denen des HCN1- und HCN4-Kanals (Biel et al. 2009).

Die vier C-Termini der HCN-Kanäle sind wie eine ringförmige Blende angeordnet („Gating“-Ring), wobei jeder C-Terminus über seine A'- und B'-Helix einen Kontakt zu den C'- und B'-Helices seines nächsten Nachbarn herstellt (Craven and Zagotta 2004). Der geschlossene Zustand der HCN-Kanäle wird in Abwesenheit von zyklischen Nukleotiden durch die C-Termini stabilisiert (Autoinhibition) (Wainger et al. 2001; Wang et al. 2001). Der *Gating*-Ring ist dann geschlossen und inhibiert die Beweglichkeit des *Gates*. Kommt es zur Bindung von cAMP an die CNBD, erfährt diese Struktur eine Konformationsänderung, die zur Dilatation dieser Blende führt. Diese Aufweitung des Rings hebt die Autoinhibition des Kanals auf. Dadurch wird die Beweglichkeit des *Gates* erhöht und die VSDs benötigen weniger Kraft um das *Gate* zu öffnen, was dem Kanal eine Öffnung bei positiveren Membranspannungswerten ermöglicht.

1.3 Die physiologische Rolle der HCN-Kanäle

Die HCN-Kanäle werden in verschiedenen Geweben exprimiert. Die höchste Expressionsrate findet man im Herz und im Gehirn. In diesen Organen wurde die physiologische Rolle der HCN-Kanäle besonders gut untersucht und charakterisiert.

1.3.1 cAMP abhängige Modulation des I_h im Sinusknoten

Im Herz ist der I_h für die Generierung und Modulation der langsamen diastolischen Depolarisation der Zellen des Sinusknoten verantwortlich und ist somit an der Entstehung des autonomen Herzschlages beteiligt (Brown et al. 1979a; DiFrancesco et al. 1989). Nach dem Ende der Repolarisationsphase bleibt in den Zellen des Sinusknotens die Membranspannung nicht konstant. So führt die Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials zu einer Öffnung der HCN-Kanäle an den Schrittmacherzellen, was die langsame diastolische Depolarisation einleitet. Erreicht die langsame diastolische Depolarisation das Schwellenpotential der T- und L-Typ Calciumkanäle, werden diese aktiviert und das nächste Aktionspotential entsteht. Dieser Prozess kann durch das vegetative Nervensystem beeinflusst werden.

Die Stimulation des Sympatikus hat eine Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin zur Folge. Diese Katecholamine führen durch eine Aktivierung von β_1 -Rezeptoren am Sinusknoten zu einem G_s -Protein vermittelten Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration durch die Adenylatzyklase. Die Bindung von cAMP an die Kanäle beschleunigt deren Aktivierung und die Dauer der langsamen diastolischen Depolarisation verkürzt sich, was eine Erhöhung der Herzfrequenz zur Folge hat (Brown et al. 1979a; Brown et al. 1979b; DiFrancesco and Tortora 1991) (Abbildung 3).

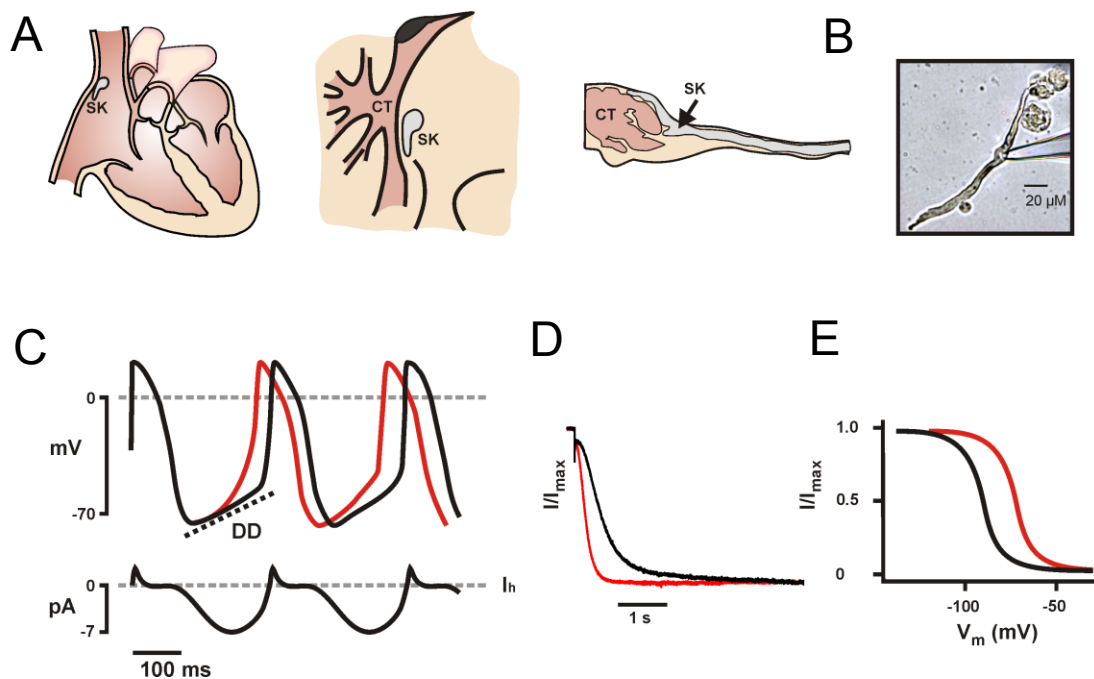


Abbildung 3: Der I_h als Schrittmacherstrom im Sinusknoten. (A) Anatomie und Lage des Sinusknotens (*crista terminalis* (CT), Sinusknoten (SK)). (B) Aufgesetzte „Patch“-Pipette an isolierter Sinusknotenzelle (C) Oben: Schrittmacherpotentiale von Sinusknotenzellen während der diastolischen Depolarisation mit (rot) und ohne (schwarz) adrenerger Stimulation. Der I_h setzt bei Hyperpolarisation der Zellen ein und führt zu einer langsamen Depolarisation bis zum Erreichen des Schwellenpotentials der T- und L-Typ Calciumkanäle, deren Aktivierung die Auslösung des nächsten Aktionspotentials zur Folge hat. Unten: Der zeitliche Verlauf der Stromamplitude des I_h in Sinusknotenzellen. (D) Die Stromkurve der HCN-Kanäle. Die Kanäle öffnen bei Hyperpolarisation und leiten einen Kationenstrom, der durch K^+ und Na^+ getragen wird (schwarz). Die Aktivierung der Kanäle wird durch cAMP beschleunigt (rot). (E) Die Aktivierungskurve von HCN-Kanälen (schwarz). cAMP verschiebt die Aktivierungskurve zu positiveren Werten (rot). (Modifiziert nach (Biel et al. 2009))

Die Stimulation des Parasympatikus hingegen, führt über die Aktivierung von M2-Rezeptoren zu einer Inhibierung der Adenylatzyklase und somit zu einer Senkung der intrazellulären

cAMP Konzentration. Dies resultiert in einer Verlangsamung der Aktivierungskinetik der HCN-Kanäle, was die Dauer der langsamen diastolischen Depolarisation verlängert und die Herzfrequenz senkt (DiFrancesco et al. 1989; DiFrancesco and Tromba 1988a; DiFrancesco and Tromba 1988b). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass noch weitere Ströme wie der I_{st} („*sustained inward current*“), die Calciumströme $I_{Ca,T}$ und $I_{Ca,L}$, sowie Kaliumströme (I_{KACH}), die durch G-Proteine aktiviert werden, und die Kaliumströme I_{kr} und I_{ks} an der Regulation der Sinusknotenfunktion beteiligt sind (Mangoni and Nargeot 2008; Stieber et al. 2004).

1.3.2 cAMP abhängige Modulation des I_h in Neuronen

Die Rolle des I_h wurde in der Vergangenheit in verschiedenen Hirnregionen untersucht. Der I_h ist dort an verschiedenen Funktionen wie der dendritischen Integration, der Bildung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses, dem Erlernen von motorischen Prozessen, der Steuerung der Langzeit-Potenzierung (LTP), der synaptischen Neurotransmission und der Generierung von rhythmischen Oszillationen im thalamokortikalen Netzwerk beteiligt (Biel et al. 2009).

Besonders gut charakterisiert ist die Funktion des I_h im thalamokortikalen Netzwerk, insbesondere bei der Entstehung von rhythmischen Einzelzelloszillationen in thalamokortikalen Neuronen (McCormick and Pape 1990) (Abbildung 4). Thalamokortikale Neurone können in zwei verschiedenen Aktivitätsmodi feuern, dem „*Transmission*“-Modus und dem „*Burst*“-Modus (Bal and McCormick 1996; Bal et al. 1995a; Bal et al. 1995b; Crunelli et al. 1987; Lüthi and McCormick 1998; Lüthi and McCormick 1999; McCormick and Pape 1988) (Abbildung 6).

Im sogenannten *Transmission*-Modus (Jahnsen and Llinas 1984a; Jahnsen and Llinas 1984b; McCormick and Feese 1990) werden Aktionspotentiale zum Kortex weitergeleitet, die den Thalamus durch verschiedene Eingangsprojektionen erreichen (McCormick and Bal 1997; Steriade et al. 1993). Dieser Modus ist durch das Auftreten von schnellen repetitiven Aktionspotentialen gekennzeichnet (Abbildung 4). Während des *Transmission*-Modus ist das Membranpotential der thalamokortikalen Neurone aufgrund afferenter *Inputs* depolarisiert (Guillery and Sherman 2002). Durch diese Depolarisation sind die T-Typ Calciumkanäle inaktiviert und die HCN-Kanäle deaktiviert (Guillery and Sherman 2002). Thalamokortikale Neurone arbeiten während des Wachzustands und während der REM-Schlafphasen im *Transmission*-Modus.

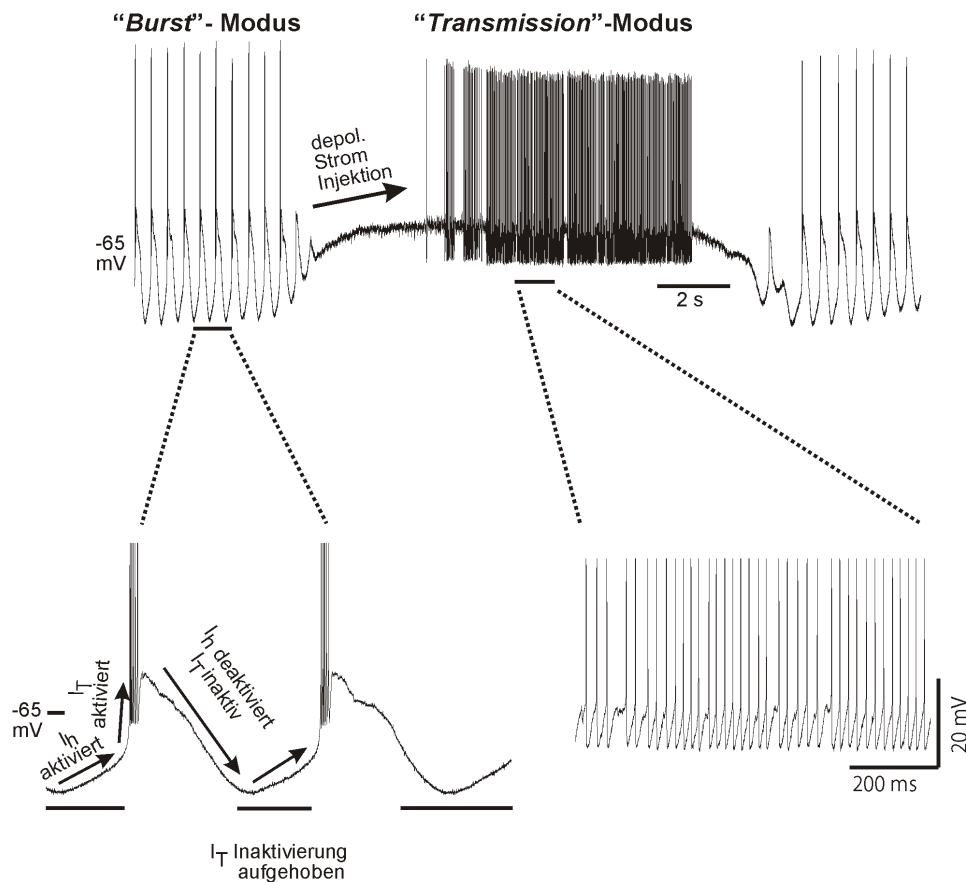


Abbildung 4: Thalamische Neurone im *Burst*-Modus und im *Transmission*-Modus. Bei einer Hyperpolarisation der thalamokortikalen Neurone öffnen die HCN-Kanäle, was zu einer langsamen Depolarisation der Membran führt. Der I_h leitet somit die salvenartige Entstehung mehrere Aktionspotentiale („*Bursts*“) hintereinander ein. Im Anschluss daran beginnt die Zelle wieder zu hyperpolarisieren und der Vorgang wiederholt sich. Die Frequenz, in welcher die Neurone im *Burst*-Modus feuern, wird durch den I_h gesteuert, der durch die intrazelluläre cAMP Konzentration moduliert wird. Liegen die thalamokortikalen Neurone depolarisiert vor, feuern sie im *Transmission*-Modus. Dieser Modus ist durch das Auftreten von schnellen repetitiven Aktionspotentialen gekennzeichnet. (Modifiziert nach (Biel et al. 2009) und (McCormick and Bal 1997))

Im Tiefschlaf (Non-REM-Schlaf) liegen die thalamokortikalen Neurone hyperpolarisiert vor und feuern im sogenannten *Burst*-Modus (Hirsch et al. 1983; Jahnsen and Llinas 1984a; Jahnsen and Llinas 1984b; Steriade and Timofeev 2003; Timofeev et al. 1996) (Abbildung 4). Wenn sich die Neurone in diesem Modus befinden, wird der Transfer von sensorischen Informationen zum Kortex reduziert (Steriade and Timofeev 2003). Dieser Modus ist durch langsame rhythmische Oszillationen des Membranpotentials gekennzeichnet, auf deren Gipfel salvenartige Aktionspotentialfolgen ausgelöst werden. (Hirsch et al. 1983; Steriade and Timofeev 2003; Timofeev et al. 1996). Getrieben wird dieser Rhythmus durch thalamoretikuläre Neurone. Diese Neurone sind GABAerg und induzieren ein inhibitorisches

postsynaptisches Potential an thalamokortikalen Neuronen (Fuentesalba et al. 2004; Sartiani et al. 2006), welches diese Zellen hyperpolarisiert. Diese Hyperpolarisation führt zur Öffnung der HCN-Kanäle, was zur Folge hat, dass die Zellmembran der thalamokortikalen Neurone depolarisiert. Beim Erreichen des Schwellenpotentials der T-Typ Calciumkanäle öffnen diese und depolarisieren die Zellmembran bis zum Gipfel der Oszillation. Auf dem Gipfel werden typischerweise Aktionspotentialsalven durch das Öffnen von spannungsgesteuerten Natriumkanälen ausgelöst. Durch die Deaktivierung des I_h und die Inaktivierung der T-Typ Calciumkanäle bei einer gleichzeitigen Aktivierung von Calcium abhängigen Kaliumkanälen, wird die Hyperpolarisation eingeleitet und der Vorgang wiederholt sich (Biel et al. 2009; McCormick and Bal 1997).

Die Frequenz, mit der die Neurone langsam oszillieren, wird durch den I_h gesteuert (Bal and McCormick 1996; Steriade and Deschenes 1984; Steriade et al. 1993). Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration führt zu einer schnelleren Öffnung der Kanäle und durch Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung dieser Kanäle zu einer Erhöhung der Frequenz der Oszillationen. Diese Erhöhung der cAMP Spiegel wird zum einen in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Neuronen durch eine Ca^{2+} -abhängige Adenylatzyklase verursacht (Lüthi and McCormick 1999). Zum anderen können die Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin über eine erhöhte cAMP Produktion die I_h Amplitude erhöhen. Dies scheint beim Übergang vom Non-REM- in den REM-Schlaf bzw. Wachzustand physiologisch relevant zu sein (Bal and McCormick 1997).

Störungen in diesem System können eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen wie beispielsweise Störungen im Schlaf / Wachzyklus hervorrufen, sowie das Auftreten von Absence-Epilepsie begünstigen (Budde et al. 2005).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Aus einem HCN2-Knockout Mausmodell ist bekannt, dass der Verlust des Kanalproteins einen Einfluss auf die Funktion des Herzens sowie die Funktion des Gehirns hat (Ludwig et al. 2003). In diesem Zusammenhang ist die physiologische Bedeutung der cAMP vermittelten Koaktivierung des HCN2-Kanals bislang nicht geklärt. Um diesen wichtigen Prozess zu untersuchen, benötigt man ein Mausmodell, bei dem der HCN2-Kanal nicht mehr durch cAMP koaktiviert wird, die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals jedoch erhalten bleibt. Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit durch Gentargeting Mutationen in die CNBD

und den C-Linker des HCN2-Gens von Mäusen eingebracht werden. Aus diesen chimären Knockin Tieren kann dann durch Verpaarung diese Mauslinie erzeugt werden. Das notwendige Arbeitsprogramm umfasste dabei folgende Schritte:

- Ausarbeiten einer Gentergeting Strategie
- Klonierung des Targetingkontrukts
- Elektroporation von ES-Zellen mit dem Targetingkonstrukt
- Selektion, Test und Injektion positiver ES-Zellen in Blastozysten
- Generierung, Zucht und Verpaarung chimärer Knockin Mäuse

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer, Kunststoffwaren

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in den Qualitäten „für molekularbiologische Zwecke“ oder „*pro analysi*“ von den Firmen VWR, Sigma-Aldrich, Biorad, Merck oder Roth bezogen. Für die Herstellung sämtlicher Lösungen wurde deionisiertes, hochreines Wasser aus einer Milli-Q Gradient Anlage der Firma Millipore verwendet. Wässrige Lösungen wurden autoklaviert, wenn diese für spezielle Anwendungen wie z.B. PCR-, Zellkulturarbeiten oder längere Lagerung bestimmt waren. 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße wurden von der Firma Brand, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße sowie 13 ml, 15 ml und 50 ml verschraubbare Kunststoffröhren, sowie Pipettenspitzen wurden von der Firma Sarstedt bezogen. Gestopfte Pipettenspitzen und Glasgeräte wie Pasteurpipetten, Bechergläser, Meßzylinder usw. stammten von der Firma VWR. Die verwendeten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml Einmalmesspipetten sowie 2 ml Kryoröhrchen für die ES-Zellkultur wurden von der Firma Greiner Bio-One bezogen.

2.2 Arbeiten mit DNA

Die molekularbiologischen Methoden dieser Arbeit richten sich größtenteils nach den Protokollen aus dem Buch: „*Molecular Cloning a Laboratory Manual*“ (Sambrook and Russell; 3. Auflage; 2001)

2.2.1 Amplifikation von DNA

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Sämtliche PCRs für Klonierungszwecke wurden mit der Phusion-Polymerase (Finnzymes) aufgrund ihrer *Proof-Reading*-Funktion durchgeführt, die sie befähigt Synthesefehler zu beheben. Des Weiteren wurden die Herculase II Fusion- (Agilent), Red Taq-Polymerase (VWR) sowie die

Taq-Polymerase (MP Biomedicals) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler T1 (Biometra) durchgeführt.

2.2.1.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden über die Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg bezogen. Die Temperatur für das *Annealing* der Primer, wurde nach folgender Formel berechnet:

$T(\text{in } ^\circ\text{C}) = ((\text{Anzahl von G und C}) \times 4 + (\text{Anzahl von A und T}) \times 2) - 4$
--

2.2.1.3 Template

Als Template wurde murine ES-Zell-DNA (129 / Sv) oder Plasmide verwendet.

2.2.1.4 Standard Phusion PCR-Ansatz

PCR-Standardreaktionsansatz

(Phusion-Polymerase):

<i>Template</i> -DNA (10-500 ng)	<i>qs</i>
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
dNTPs (1,25 mM)	8 µl
5 x Puffer (GC)	10 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

Reaktionsbedingungen (Phusion-Polymerase):

Initiale Denaturierung 98 °C 30 s

Denaturierung	98 °C	10 s	35-40 Zyklen
<i>Annealing</i>	je nach Primern	30 s	
Elongation	72 °C	30 s / kb	
Finale Polymerisation	72 °C	10 min	
Aufbewahrung	10 °C	∞	

2.2.1.5 Gezielte Mutagenese

Das Triplet 449 im Exon 4 des HCN2 Gens wurde durch gezielte Mutagenese mit den Mutationsprimern HCN2Ex4Y449Ffor und HCN2Ex4Y449Frev unter Verwendung des Quikchange II XL Site Directed Mutagenesis Kits (Agilent) von TAC zu TTC geändert. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.2.1 Restriktionsverdau

Es wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs verwendet. Die Pufferbedingungen, DNA- und Enzymmengen, die Temperatur sowie Inkubationszeiten richteten sich nach den Angaben des Herstellers.

Präparativer Standardrestriktionsansatz:		Analytischer Standardrestriktionsansatz:	
DNA (bis zu 4 µg)	<i>qs</i>	DNA (250 ng oder 3 µl	<i>qs</i>
10 x Puffer (je nach Enzym	5 µl	Plasmidpräparation (2.2.5.3))	
NEB1-4)		10 x Puffer (je nach Enzym	1,5 µl
10 x BSA (je nach Enzym)	5 µl	NEB1-4)	
Restriktionsendonuklease	1 µl	10 x BSA (je nach Enzym)	1,5 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 50 µl	Restriktionsendonuklease	0,1-0,15 µl
		(je nach Enzym)	
		H ₂ O	<i>ad</i> 15 µl

2.2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation muss verhindert werden, dass es zu einer Religation des zuvor durch die Restriktionsendonuklease geschnittenen Vektors kommt. Dazu wurde der Vektor vor der Ligation mit einer speziellen Phosphatase behandelt. Diese Phosphatase ist in der Lage, die 5'-Phosphatgruppen der DNA abzuspalten. Da die Ligase für die Ligation von DNA diese 5'-Phosphatgruppen benötigt, kann es nur zwischen dem in dem Ligationsansatz befindlichen Insert und dem Vektor zu einer Ligation kommen. Die Dephosphorylierung wurde nach einer Gelaufreinigung oder Phenol Chloroform Extraktion mit anschließender Natriumacetatfällung des Vektors durchgeführt. Als Phosphatase wurde die CIP (New England Biolabs) sowie die rAPid Alkalische Phosphatase (Rapid DNA Dephos & Ligation Kit, Roche) verwendet.

Standarddephosphorylierungsansatz (CIP):

DNA (bis zu 4 µg)	<i>qs</i>
10 x Puffer NEB3	3 µl
CIP	1 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 30 µl

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die rAPid Alkalische Phosphatase (Roche) wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten katalysiert die DNA-Ligase unter ATP Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe der DNA. Dadurch wird eine Verknüpfung von DNA mit zueinander kompatiblen Enden möglich. Diese Methode ermöglicht den Einbau von DNA-Fragmenten in zuvor geschnittene und dephosphorylierte Vektoren. Als DNA-Ligase wurde die T4-DNA-Ligase von NEB sowie die T4-Ligase von Roche (Rapid DNA Dephos & Ligation Kit) verwendet.

Standardligationsansatz (T4-Ligase NEB):

Vektor (50-70 ng)	<i>qs</i>
Insert (150-210 ng)	<i>qs</i>
T4-Ligase Puffer	1,5 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 15 µl

Die Menge des verwendeten Inserts lag ca. 2- bis 3-fach über der des Vektors. Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C über Nacht im Wasserbad belassen. Die T4-Ligase von Roche wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Dazu wurden 0,7 % Agarosegele für DNA-Fragmente größer als 700 bp und 2 % Agarosegele für DNA-Fragmente kleiner als 700 bp verwendet. Die Gele wurden durch Aufkochen der entsprechenden Menge an Agarose (peqGOLD Universal-Agarose, Peqlab) in 1 x TBE in einer Labormikrowelle angefertigt. Nach dem Abkühlen der Agarose auf 50 °C wurde diese mit Ethidiumbromidlösung (10 mg / ml) versetzt, sodass die Agaroselösung eine Endkonzentration von 800 ng / ml besaß. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, wodurch diese unter UV-Licht (Gel Doc 200, Biorad) detektiert werden kann. Das Gel wurde dann in entsprechende Gelträger gefüllt, in die ein Kamm zur Formung der Taschen gesteckt wurde. Die Gelelektrophorese fand in einer horizontalen Gelkammer (für Southern und präparative Gele in Kammern der Firma Peqlab, für analytische Gele in einer Run one Apparatur (Embitec)) in 1 x TBE Laufpuffer statt. Als Spannung wurden 80-135 V in diesen Kammern angelegt. Als Größenvergleich wurde ein DNA-Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen bzw. O' Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen. Als Gelladepuffer wurde den Proben 6 x Dye zugesetzt. Dieser Ladepuffer enthielt Ficoll Typ 400, welcher der DNA-Lösung eine höhere Dichte verleiht und dadurch die Proben in die Geltaschen absinken lässt. Die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol migrieren wie die negativ geladene DNA im elektrischen Feld und dienen so als optische Verlaufskontrolle der Elektrophorese.

10 x TBE		6 x Dye (Gel-Ladepuffer)	
Tris	540 g	10 x TBE	60 ml
Borsäure	275 g	Ficoll Typ 400	18 g
0,5 M EDTA pH8,0	200 ml	0,5 M EDTA pH 8,0	24 ml
H ₂ O	<i>ad</i> 5 l	Bromphenolblau 50 mg / ml	3 ml
		Xylencyanol 50 mg / ml	3 ml
		H ₂ O	<i>ad</i> 100 ml
1 x TBE (Gel-Laufpuffer)			
10 x TBE	1 l		
H ₂ O	9 l		
pH 7,2-7,5			

2.2.4 Aufreinigung von DNA

Nach der Auftrennung von DNA in Agarosegelen oder nach DNA modifizierenden Verfahren ist es notwendig, diese vor der Weiterverwendung zu extrahieren oder aufzureinigen. Dazu kamen verschiedene Verfahren zur Anwendung.

2.2.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um die DNA von Puffern und Proteinen wie beispielsweise Polymerasen abzutrennen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit Wasser *ad* 300 µl aufgefüllt, mit 300 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) versetzt und mit einem Schüttler (Reaxtop, Heidolph) gemischt. Danach wurde mit 16.100 g für 2 min zentrifugiert (Mikrozentrifuge, Eppendorf) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde dann mit 300 µl Chloroform versetzt, gemischt und erneut mit 16.100 g für 2 min zentrifugiert. Diese obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA danach mittels Ethanol und Natriumacetat präzipitiert.

2.2.4.2 Ethanol-Natriumacetat Präzipitation von DNA

Zur Präzipitation von DNA wurde der Lösung 1 / 10 ihres Volumens an einer 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 zugegeben. Dieser Ansatz wurde dann mit der 2,5-fachen Menge seines Volumens mit eiskaltem Ethanol versetzt. Diese Mischung wurde 15 min bei -80 °C gelagert und im Anschluss mit 16.100 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und mit 16.100 g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in einer geeigneten Menge an Wasser gelöst.

2.2.4.3 Aufreinigung mittels Silicasäulen

Um DNA aus einem Agarosegelstück nach der Gelelektrophorese zu extrahieren, wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Aufreinigung wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das Gelstück wurde gewogen und mit der 3-fachen Menge an QC-Puffer versetzt. Diese Mischung wurde für 15 min bei 50 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) mit 700 rpm geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte über Silicasäulen mittels Affinitätschromatographie nach den Anweisungen des Herstellers.

2.2.5 Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.5.1 Verwendete Plasmide

In dieser Arbeit wurden die Plasmide pBlueskript II SK / KS (+) (Stratagene) und pUC18 (Invitrogen) für die Klonierung verwendet. Der pBlueskript II SK / KS (+) mit einer veränderten multiplen Klonierungsstelle wurde zur Assemblierung des Targetingkonstrukts verwendet. Alle diese Plasmide verfügen über ein Ampicillin-Resistenzgen, mit dessen Hilfe Bakterien, die dieses Plamid nach einer Transformation aufgenommen haben, durch Ampicillin selektioniert werden können.

2.2.5.2 Transformation und Kultur von *E. coli*-Bakterien

Um Plasmide in Bakterien einzuschleusen wurden transformationskompetente *E. coli*-Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt. Verwendet wurden *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF (Stratagene) und der Methylase defiziente *E. coli*-Stamm ER2925 (New England Biolabs). Es wurden 100 µl eines entsprechenden *E. coli*-Aliquots zu 5-15 µl eines Ligationsansatzes, oder 10 ng eines Plasmids gegeben. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in einem 42 °C warmen Wasserbad (K10, Haake) einem Hitzeschock für 45 s ausgesetzt. Die Bakterien wurden dann 2 min auf Eis gekühlt, mit 900 µl LB(+)-Medium versetzt und 2 h bei 37 °C mit 225 rpm in einem Inkubator (Certomat IS, B. Braun Biotech International) inkubiert. Der Ansatz der transformierten Bakterien wurde im Anschluss 5 min bei 800 g pelletiert. 900 µl des Überstandes wurden verworfen, die Bakterien in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und mithilfe eines Drigalskispatels auf Ampicillinhaltige Agarplatten (c = 100 µg / ml) ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank (Heraeus Function Line, Thermo Scientific) gelagert. Am nächsten Tag waren bei einer erfolgreichen Ligation und Transformation die Bakterien als Kolonien sichtbar und konnten zum Animpfen von Ampicillinhaltigem LB(+)-Medium verwendet oder bei 4 °C gelagert werden.

LB(+)-Medium		LB(+)-Agar	
Pepton	10 g	Agar	15 g
Hefeextrakt	5 g	LB(+)-Medium	ad 1000 ml
NaCl	5 g		
Glucose	1 g		
H ₂ O	ad 1000 ml		
	pH 7,2-7,5		

2.2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Durch eine Präparation von Plasmiden im kleinen Maßstab kann aus den nach der Transformation gewachsen Bakterienkolonien eine ausreichende Menge Plasmid-DNA durch alkalische Lyse gewonnen werden. Ein Restriktionsverdau dieser Plasmid-DNA ermöglicht eine Analyse des präparierten Plasmids. Zur Vorbereitung einer Minipräparation wurden 7 ml LB(+)-Medium mit 14 µl Ampicillinlösung (c = 50 mg / ml) in einer verschraubbaren

13 ml Plastikröhre versetzt. Von der Agarplatte wurden dann mit einer sterilen Pipettenspitze diese Röhren angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm in einem Inkubator (Certomat IS, B. Braun Biotech International) inkubiert. Am nächsten Tag wurden von diesen Bakteriensuspensionen 2 ml in je ein Reaktionsgefäß überführt. Diese Bakterien wurden bei 1200 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl 4 °C kaltem MP1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 250 µl MP2-Puffer zugegeben, der Ansatz kurz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde mit 250 µl 4 °C kaltem MP3-Puffer neutralisiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann 15 min bei 4 °C und 16.100 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren wurden 525 µl Isopropanol zugegeben, die Lösung kurz gemischt und die Plasmid-DNA für 15 min bei 4 °C und 16.100 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß kurz auf einem Papiertuch getrocknet. Es wurden 700 µl 70 % Ethanol zum Waschen auf das Pellet gegeben und eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 16.100 g durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß auf einem Papiertuch kurz getrocknet. Das Reaktionsgefäß mit dem Pellet wurde dann offen in einer Vakuumzentrifuge (VR Maxi, Hareaus) für 15 min im Vakuum zentrifugiert, bis der restliche Ethanol verdampft war. Das Pellet wurde dann in 25 µl Wasser gelöst und 3 µl dieser Lösung für einen analytischen Restriktionsverdau verwendet. Die so gewonnene Plasmid-DNA konnte vor der Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab gereinigt, die Menge an präparierter DNA photometrisch quantifiziert und sequenziert werden.

MP1-Resuspensionspuffer pH 8		MP2-Lysepuffer	
Tris	6,06 g	NaOH	8 g
EDTA	3,72 g	SDS-Lösung (10 %)	100 ml
RNaseA	100 mg	H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
Salzsäure (37%)	<i>qs</i>		
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml		
MP3-Neutralisationspuffer		3 M Neutralisationspuffer pH 5,5	
3 M Kaliumacetat pH 5,5	500 ml	Kaliumacetat	294,5 g
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	Eisessig	<i>qs</i>
		H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml

2.2.5.4 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)

Für eine Plasmidpräparation im Großmaßstab wurden 100 ml LB(+)-Medium in einem Glaskolben mit 200 µl Ampicillinlösung ($c = 50 \text{ mg / ml}$) versetzt. Das Medium wurde mit Bakteriensuspension (aus 2.2.5.3) oder direkt mit einem Bakterienklon von der Agarplatte nach einer Retransformation von Plasmiden angeimpft. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C und 225 rpm in einem Inkubator (Certomat IS, B. Braun Biotech International) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienlösung auf zwei 50 ml Kunststoffröhren aufgeteilt und bei 4 °C für 15 min bei 5000 g zentrifugiert (J2MC Centrifuge, Beckman Coulter). Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Säulenchromatographie mit dem Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega) nach den Angaben des Herstellers. Abweichend davon wurde mit einem Faltenfilter (VWR) die Lösung vor dem Aufbringen auf die *Clearing Column* zusätzlich gefiltert um ein mögliches Verstopfen der Vorreinigungssäule zu verhindern. Die präparierte DNA wurde quantifiziert, analytisch verdaut und sequenziert.

2.2.5.5 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde mithilfe eines Photometers (BioPhotometer, Eppendorf) bei einer Absorption von 260 nm in einer Quarzküvette (Hellma) bestimmt. Die optische Dichte bei dieser Wellenlänge (OD_{260}) entspricht 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Menge von 50 µg / µl doppelsträngiger DNA.

2.2.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde nach einer modifizierten Methode nach Sanger von der Firma MWG Operon durchgeführt. Die Proben und Primer wurden nach den vorgegebenen Anforderungen vorbereitet und verdünnt.

2.2.7 Generierung von Klonierungsvektoren mit individueller MCS

Für manche Klonierungsschritte war es notwendig, dass bestimmte Restriktionsschnittstellen in einer festgelegten Reihenfolge in einem Klonierungsvektor vorlagen. Als Ausgangsvektor

diente dazu der Vektor pBlueskript SK / KS (+). Die MCS dieses Vektors wurde durch einen präparativen Verdau entfernt. Der Vektor wurde über ein Agarosegel von dem DNA-Fragment abgetrennt, aus dem Gelstück eluiert und dephosphoryliert. Von der Firma MWG Operon wurden Oligodesoxynukleotide mit der gewünschten Sequenz und mit 5'-Phosphatresten hergestellt. Bei der Planung der Sequenz für die neue MCS war es wichtig darauf zu achten, dass zwischen zwei benachbarten Erkennungssequenzen, an denen eine Restriktion stattfinden soll, genügend zusätzliche Basen eingefügt werden. Dies ist bei einigen Restriktionsendonukleasen notwendig, um einen effizienten Verdau zu ermöglichen. Zur Herstellung einer neuen MCS für den pBlueskript SK / KS (+) Vektor wurden zwei Oligodesoxynukleotide benötigt. Eines dieser Oligodesoxynukleotide bestand aus der gewünschten Sequenz in Vorwärtsrichtung, das andere war zu dieser Sequenz rückwärts komplementär, sodass sich diese Oligodesoxynukleotide zu einem doppelsträngigen DNA-Strang zusammenlagern konnten. Um die neue MCS durch Ligation in den mit BssH II geschnittenen Vektor einzufügen, mussten am 5'- sowie am 3'-Ende entsprechende Überhänge vorhanden sein. Dazu befand sich an beiden 5'-Enden die Sequenz CGCGC und an den beiden 3'-Enden ein zusätzliches G. Die Oligodesoxynukleotide wurden auf die Konzentration 1 pmol / µl verdünnt und je 50 µl der zueinander komplementären Oligodesoxynukleotide in ein Reaktionsgefäß überführt. Ein 50 ml Becherglas wurde mit 75 °C warmen Wasser gefüllt und in einem Wasserbad von außen auf dieser Temperatur gehalten. Das Reaktionsgefäß wurde auf 75 °C in dem Becherglas erwärmt, danach wurde das Becherglas mit dem Reaktionsgefäß aus dem Wasserbad genommen und somit langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, was zur Zusammenlagerung der beiden Oligodesoxynukleotide führte. Die MCS wurde im Anschluss mit der T4-Ligase (New England Biolabs) in den Vektor ligiert.

2.2.8 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine Methode um DNA-Fragmente aus einem DNA-Fragmentgemisch nachzuweisen. Die Fragmente werden dazu über ein Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Um die DNA-Fragmente spezifisch nachzuweisen wird die Membran mit einer radioaktiv markierten Gensonde, die zu einem Teil des DNA-Fragments komplementär ist, hybridisiert. Diese Fragmente können dann autoradiographisch detektiert werden, nachdem die Sonde spezifisch an diese DNA-Fragmente gebunden hat. Mithilfe dieses Verfahrens konnte die korrekte Integration des

Targetingkonstrukts in den Lokus des HCN2-Gens überprüft werden. Dazu wurde ES-Zell DNA mit den entsprechenden Enzymen der Southern Blot Strategie verdaut. Die dadurch entstandenen DNA-Fragmente konnten dann mit einer radioaktiv markierten Gensonde detektiert werden. Aufgrund der vorher berechneten Fragmentlängen konnten von den autoradiographisch ausgewerteten Membranen Rückschlüsse auf die Korrektheit der Integration des Targetinkonstrukts in den dafür vorgesehenen Lokus gezogen werden.

2.2.8.1 Verdau von genomischer ES-Zell DNA

Der Verdau der ES-Zell DNA wurde in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Es wurden 12 µl der ES-Zell DNA verdaut, was im Durchschnitt etwa 3 µg DNA entsprach. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht inkubiert um einen quantitativen Verdau der DNA zu ermöglichen.

2.2.8.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Restriktionsansätze der ES-Zell DNA wurden über ein 0,6 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 50 µl 1 kb DNA-Ladder (Invitrogen) oder 30 µl O' Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) aufgetragen. Zuerst wurde eine Spannung von 80 V an die Gelkammern angelegt, die nachdem die Farbstoffbanden des Markers zu sehen waren, auf 100 V erhöht wurde. Nach der Gelelektrophorese der DNA wurden die Gele unter UV-Licht mit einem Lineal als Referenz photographiert (Gel Doc 200, Biorad). Dies war notwendig um nach der autoradiographischen Auswertung einen Bezug zum Größenmarker des entsprechenden Gels herstellen zu können. Das Agarosegel wurde nun für 10 min in 0,2 M Salzsäure gegeben und auf einem Schüttler (Rotamax 120, Heidolph) vorsichtig geschwenkt. Dies resultierte in einer partiellen Depurierung der DNA, was zu Strangbrüchen führte und somit den Transfer von DNA-Fragmenten aus dem Gel auf die Membran erleichtert. Um die DNA-Doppelstränge vor dem Transfer auf die Membran zu denaturieren, wurde das Gel 2-mal 30 min in einer Lösung aus 0,5 M Natronlauge und 1,5 M Natriumchlorid unter langsamen Schwenken inkubiert. Im Anschluss an die Denaturierung wurde der pH-Wert des Gels durch 2-maliges 30-minütiges Schwenken in einer Lösung aus 0,5 M Tris pH 8 und 3 M NaCl neutralisiert.

2.2.8.3 Transfer der DNA auf Membranen (Blotting Verfahren)

Um die DNA aus dem Gel auf die dazu verwendete Nylonmembran (Genescreen plus, Perkin Elmer) zu transferieren, wurden in eine Metallwanne 2 bis 3 rechteckige Viskoseschwämme gleicher Höhe gelegt. Die Schwämme wurden mit 10 x SSC getränkt und die Wanne mit 10 x SSC bis zur Hälfte gefüllt. Ein in 10 x SSC getränktes saugfähiges Papier (3 mm, Whatmann) wurde auf die Schwämme und darauf das Gel gelegt. Die Nylonmembran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten, 2 min in 10 x SSC äquilibriert und auf das Gel gelegt. Danach folgte erneut ein in 10 x SSC getränktes saugfähiges Papier (3 mm, Whatmann). Wichtig war es, den Aufbau der einzelnen Komponenten blasenfrei durchzuführen. Die freien Bereiche der Viskoseschwämme wurden mit Parafilmstreifen (Parafilm „M“, Pechiney Plastic Packaging) bedeckt. Den Abschluss bildete ein Stapel saugfähiger Papierhandtücher, der aufgrund seiner Kapillarkraft die 10 x SSC Lösung durch das Gel und die Membran saugen konnte. Mithilfe dieses Soges wurde die DNA aus dem Gel auf die Membran übertragen (Abbildung 5).

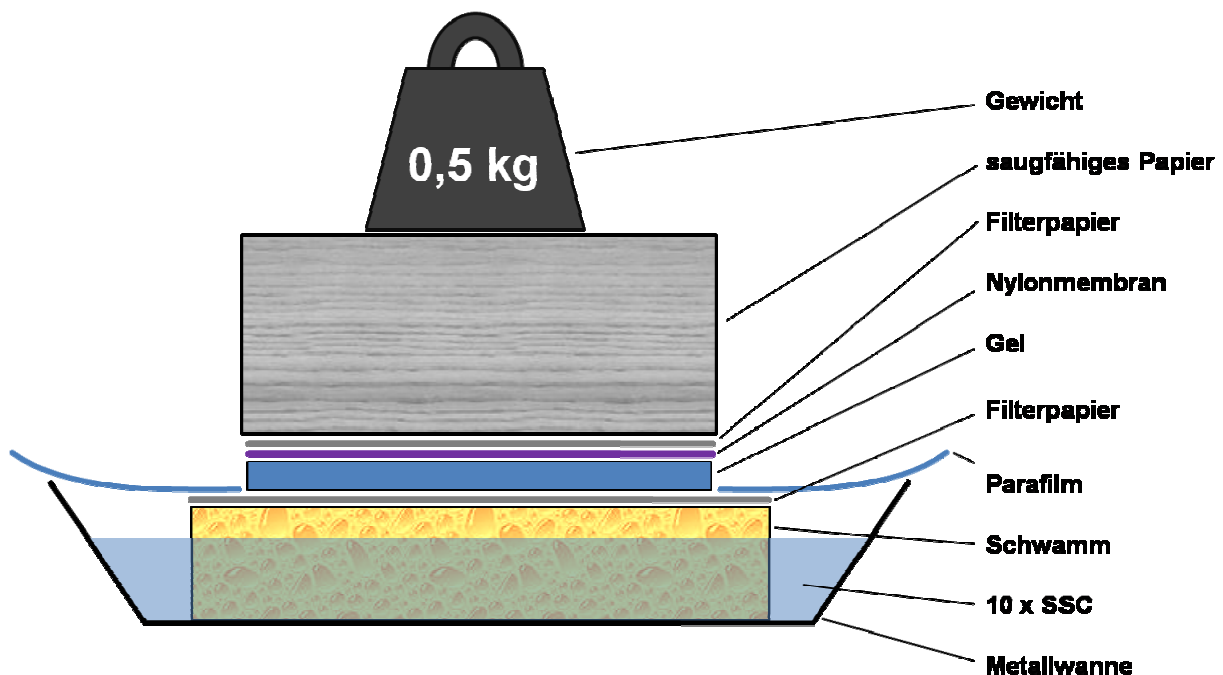


Abbildung 5: Detaillierter Aufbau eines Southern Blots. Gezeigt ist der Aufbau eines Southern Blots zum Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran. Die einzelnen Komponenten wurden auf die in 10 x SSC getränkten Schwämme aufgebaut. Dabei wurde auf Blasenfreiheit zwischen den einzelnen Schichten geachtet.

Dieser Aufbau wurde insgesamt für 16 h stehen gelassen um die DNA aus dem Gel auf die Membran zu transferieren. Nach 12 h wurde der Stapel mit den saugfähigen Papiertüchern gewechselt. Der Blot wurde dann vorsichtig von oben bis zur Membran hin abgebaut. Die Taschen des Gels wurden mit einem Kugelschreiber auf der Membran markiert um später einen Referenzpunkt zum Gel zu haben. Die Membran wurde dann vorsichtig mit einer Pinzette vom Gel entfernt und auf einem Papiertuch 2-mal mit UV-Licht mit einer Energie von 120 mJ / cm² (CI-1000 Ultraviolett Crosslinker, UVP) bestrahlt, anschließend luftgetrocknet und die Taschenmarkierung auf der DNA-Seite mit einem Bleistift nachgezogen.

2.2.8.4 Herstellung einer ³²P markierten DNA-Sonde

Die Templates für die DNA-Sonden wurden mittels PCR amplifiziert. Das gewünschte PCR-Produkt wurde über ein präparatives Agarosegel von unspezifischen PCR-Produkten abgetrennt. Die Bande mit der richtigen Fragmentgröße wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und zur optischen Kontrolle der Qualität der Sonden je 1 µl der DNA-Sonden auf ein analytisches Gel aufgetragen. Die radioaktiv markierten Sonden wurden unter Verwendung von ³²P markierten Desoxycytidintriphosphat (Perkin Elmer, 37 MBq) mit dem Random Prime Labeling Kit (Roche) nach einem modifizierten Protokoll hergestellt. Von den Gensonden wurden 150 ng DNA mit H₂O *ad* 14 µl verdünnt und für 10 min bei 99 °C in einem Heizblock (Thermomixer, Eppendorf) denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt und mit einer Tischzentrifuge (Poly Labo) zentrifugiert. Die nächsten Arbeitsschritte wurden hinter Plexiglastrennwänden durchgeführt und der Arbeitsplatz regelmäßig mit einem Kontaminationsmonitor (LB 122, Berthold) auf mögliche Kontaminationen geprüft. Die für die Reaktion notwendigen Reagenzien wurden in der aufgeführten Reihenfolge zum Ansatz pipettiert. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1,5 h in einem Heizblock (Thermomixer, Eppendorf) inkubiert.

Standardeaktionsansatzs zur Herstellung
einer ^{32}P markierten Gen-Sonde:

Gen-Sonde 150 ng	14 μl
dDTP-Mix	6,0 μl
<i>Reaktion</i> -Mix	4,0 μl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	14,0 μl
Klenow-Enzym	2,0 μl

2.2.8.5 Aufreinigung der DNA-Sonde mittels Größenausschluss-Chromatographie

Der Reaktionsansatz wurde dann über eine Säule (Nick Column, GE-Healthcare) aufgereinigt um die vom Klenow Enzym synthetisierte DNA-Sonde von nicht eingebauten $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP abzutrennen. Dazu wurde die Säule in ein Stativ eingespannt und mit 3 ml TE-Puffer äquilibriert. Die 40 μl des Reaktionsansatzes und 360 μl TE-Puffer wurden auf die Säule gegeben und das Eluat in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Im Anschluss daran wurden 400 μl TE-Puffer auf die Säule gegeben und das Eluat, das die radioaktiv markierte Gen-Sonde enthielt, aufgefangen. Dieser Vorgang wurde 4-mal mit 250 μl TE-Puffer wiederholt. Je 2 μl dieser sechs Fraktionen wurden nun in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert, für die zweite Fraktion wurden in zwei PCR-Reaktionsgefäße je 2 μl gegeben um mögliche Pipettierfehler zu minimieren. Die Proben wurden dann in einem Szintillationszähler (LS 6500 Multi Purpose Scintillation Counter, Beckman) vermessen. Bei erfolgreicher Synthese der radioaktiven Sonde war die Intensität der Strahlung in der Fraktion 2 deutlich höher als in den anderen Fraktionen. War die Intensität um das 2-fache höher als die in der Fraktion 3, war die Sonde für das Experiment geeignet. Aus den Mittelwerten der beiden Messungen für die Fraktion 2 konnte dann die Intensität der Strahlung pro μl berechnet werden. Diese Gen-Sonde wurde dann direkt weiter verwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.8.6 Prähybridisieren von Southern Blot Membranen

Die Membran wurde mit der DNA-Seite nach innen eingerollt und in eine Glasschraubröhre (Biometra) überführt. Zu einer kleinen Membran (12 cm x 14 cm) wurden 20 ml, zu den größeren Membranen 25 ml auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmter Church-Puffer gegeben. Die Glasröhren wurden dicht mit einem Deckel verschraubt und in einem Hybridisierungssofen (Binder) bei

60 °C für 3 h unter Drehen auf Stufe 2 hybridisiert. Nach 45 min wurde geprüft, ob die Membran blasenfrei an der Glaswand der Röhre anlag. War dies nicht der Fall, wurden die Luftblasen mit einer Pinzette durch vorsichtiges Ablösen und Wiederanheften der Membran an die Glaswand oder durch vorsichtiges Herausstreichen mit einer 10 ml Einmalmesspipette entfernt.

2.2.8.7 Hybridisieren von Southern Blot Membranen

Zur Vorbereitung der Gen-Sonde wurde Wasser in einem Topf zum Kochen gebracht. Für eine kleine Membran wurden $1,25 \times 10^7$ cpm, für eine große Membran $1,67 \times 10^7$ cpm der Gen-Sonde verwendet. Die entsprechende Menge der Gensonde wurde in ein Reaktionsgefäß (Mikro-Schraubröhre 1,5 ml, Sarstedt) pipettiert und *ad* 200 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 10 min in siedendem Wasser erhitzt, 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend in den Church Puffer der Hybridisierungsrolle pipettiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte bei 60 °C über Nacht im Hybridisierungssofen.

2.2.8.8 Waschen von Southern Blot Membranen

Am nächsten Tag wurde der Church Puffer mit der Gen-Sonde entfernt und die Membran mit 100 ml 1 x SSC, 0,1 % SDS durch Schwenken gewaschen. Diese Lösung wurde durch neue ausgetauscht und die Membran im Hybridisierungssofen bei 62 °C auf Stufe 2 für 30 min gewaschen. Danach wurde die Lösung wieder entfernt und die Membran 2-mal mit 0,4 x SSC, 0,1 % SDS auf Stufe 2 für 30 min gewaschen, wobei die Temperatur beim ersten Waschschrift 68 °C, beim zweiten 70 °C betrug.

2.2.8.9 Auswertung von Southern Blot Membranen

Nach dem Waschen wurden die Membranen faltenfrei in haushaltsübliche Frischhaltefolie eingeschlagen und mit der DNA-Seite nach oben in eine Filmkassette gelegt. Auf die Membran wurde dann eine zuvor mit einem „Eraser“ (Raytest) durch weißes Licht gelöschte Phosphoimagerplatte (BAS-MP 2040S, Fujifilm) gelegt und die Filmkassette verschlossen. Nach 16 h wurde die Platte in gedimmten Licht in einem Phosphoimager (BAS-1500,

Fujifilm) ausgelesen und mit der Software BAS-Reader und TINA (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) ausgewertet und bearbeitet.

2.2.8.10 Verwendete Lösungen

3 M NaCl		0,2 M Salzsäure	
NaCl	175,32 g	Salzsäure (37 %)	10 ml
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml
1 M Tris pH 8		0,5 M EDTA pH 8	
Tris	121,14 g	EDTA	93,06 g
Salzsäure 37 %	<i>qs</i>	5 M NaOH	<i>qs</i>
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml
5 M NaOH		1 M Na ₂ HPO ₄	
NaOH	100 g	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	355,98 g
H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml	H ₂ O	<i>ad</i> 2000 ml
SDS (20 %)		1 M NaH ₂ PO ₄	
SDS	200 g	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	69,00 g
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml
0,5 M Tris / 3 M NaCl		TE-Puffer	
1 M Tris pH 8	500 ml	1 M Tris pH 8	10 ml
NaCl	175,32 g	0,5 M EDTA pH 8	2 ml
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml
20 x SSC		10 x SSC	
NaCl	350,60 g	20 x SSC	1 l
Natriumcitrat · 2H ₂ O	175,32 g	H ₂ O	<i>ad</i> 2 l
H ₂ O	<i>ad</i> 2 l		

0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl		„Herring Sperm“ DNA 10 mg / ml	
NaOH	20 g	„Herring Sperm“ DNA	500 mg
NaCl	87,66 g	H ₂ O	<i>ad</i> 50 ml
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml		
Church-Puffer			
BSA	5 g		
H ₂ O	<i>ad</i> 50 ml	unter erwärmen lösen (max. 65 °C)	
1 M NaH ₂ PO ₄	56,5 ml		
1 M Na ₂ HPO ₄	193,5 ml		
SDS (20 %)	175 ml		
0,5M EDTA pH 8	1 ml		
„Herring Sperm“	5 ml	5 min bei 10 °C im Wasserbad	
DNA 10 mg / ml		denaturieren	
H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml		
0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl		1 x SSC / 0,1 % SDS	
NaOH	20 g	20 x SSC	50 ml
NaCl	87,66 g	SDS (20 %)	5 ml
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
0,4 x SSC / 0,1 % SDS			
20 x SSC	20 ml		
SDS (20 %)	5 ml		
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml		

2.3 Gentergeting muriner embryonaler Stammzellen

Das Gentergeting wurde im Arbeitskreis Molekulare Medizin (Prof. Dr. Reinhard Fässler) am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Dr. Markus Moser nach einem etablierten Protokoll „*Integrin Gene Targeting*“ (Talts et al. 1999) durchgeführt. Abweichend davon wurde keine Negativselektion mit Ganciclovir durchgeführt. Die am MPI für Biochemie verwendeten Kunststoffwaren wie Messpipetten, Kunststoffröhrchen, sowie 96- und 24-Well Zellkulturplatten stammten von der Firma Corning. Die Lieferanten der

verwendeten Reagenzien, Medien und Chemikalien für die ES-Zellkultur sind in dem Protokoll „*Integrin Gene Targeting*“ (Talts et al. 1999) aufgeführt. Abweichend davon wurde das G 418 (Geneticin) und FBS von der Firma PAA, LIF von der Firma Millipore und DMSO von der Firma Sigma bezogen. Sämtliche Arbeiten mit ES-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde unter Sicherheitswerkbänken mit dem „*Laminar Air Flow*“-Prinzip gearbeitet und nur sterile bzw. autoklavierte Reagenzien, Verbrauchsmaterialien oder Laborgeräte verwendet. Alle Lösungen wurden vor dem Gebrauch auf 37 °C in einem Wasserbad erwärmt. Die Geräte und Gefäße wurden vor dem Einbringen in die Sicherheitswerkbank mit 80 % Ethanol desinfiziert. Die Kultur der ES-Zellen erfolgte auf Feederzellen in ES-Zellmedium mit 1 x LIF und G 418 (500 µg / ml) bei 37 °C unter 5 % CO₂.

2.3.1 Vorbereitung des Targetingvektors zur Elektroporation

Für die Elektroporation des Targetingvektors waren besonders große und hochreine Mengen an Plasmid-DNA nötig. Dazu wurden 500 ml LB(+)-Medium mit transformierten Bakterien, welche den Targetingvektor trugen, angeimpft und mit dem Large Construct Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Identität der gewonnenen Plasmid-DNA wurde durch einen analytischen Verdau mit anschließender Gelelektrophorese und durch Sequenzanalyse verifiziert. Vor der Elektroporation in murine ES-Zellen musste der Targetingvektor linearisiert werden um eine homologe Rekombination des Targetingkonstrukts in den dafür vorgesehen Lokus zu erzielen. Dafür wurden 100 µg des Targetingvektors in NEB4-Puffer (New England Biolabs) mit 5 µl Asc I (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 300 µl für 4 h bei 37 °C verdaut. Die Vollständigkeit des Verdau wurde überprüft, indem 1 µl des Verdau auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen wurde. Im Anschluss daran wurde der linearisierte Targetingvektor aus dem Restriktionsansatz extrahiert. Bei der Extraktion des Targetingkonstrukts wurde der Ansatz nach der Zugabe der 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 und der 2,5-fachen Menge an Ethanol vorsichtig invertiert, bis die DNA als weiße Flocke zu sehen war. Die DNA-Flocke wurde mithilfe einer Pipettenspitze in ein neues Reaktionsgefäß, das 1 ml 70 % Ethanol enthielt, überführt. Die präparierte DNA-Flocke konnte so bis zur Elektroporation bei -20 °C gelagert werden.

2.3.2 Elektroporation des Targetingvektors in murine ES-Zellen

Der Targetingvektor wurde in Kooperation mit dem Max Planck Institut, durch Dr. Markus Moser in die ES-Zellen nach dem Protokoll „*Integrin Gene Targeting*“ (Talts et al. 1999) elektroporiert. Die ES-Zellen wurden dann auf acht 10 cm Zellkulturschalen mit Feederzellen ausgesät und in ES-Zellmedium bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde zur Positivselektion das Medium gegen G 418 (Geneticin) haltiges ES-Zellmedium, das 1 x LIF enthielt, ausgetauscht. Dadurch konnten nur die ES-Zellen überleben, welche das Targetingkonstrukt in ihr Genom integriert hatten.

2.3.3 Picken und Kultur von ES-Zellklonen

Am achten Tag nach der Elektroporation konnte mit dem Picken der Klone begonnen werden, wenn sich die meisten der ES-Zellkolonien unter dem Stereomikroskop (Stemi2000, Zeiss) als weiße, scharf begrenzte, runde bis ovale ES-Zellkolonien von den darunterliegenden Feederzellen abgehoben hatten. Dazu wurden die Vertiefungen einer 96-Well-Zellkulturplatte mithilfe einer Glaspipette mit je zwei Tropfen Trypsin-EDTA-Lösung gefüllt und auf 37 °C im Brutschrank erwärmt. Die ES-Zellen wurden vorsichtig von den Feederzellen mithilfe einer Pipette (Pipetman, Gilson), die auf 8 µl eingestellt war, unter dem Stereomikroskop (Stemi2000, Zeiss) abgelöst und aufpipettiert. Der ES-Zellklon wurde dann durch 2-maliges Auf- und Abpipettieren in eine Vertiefung der vorher befüllten 96-Well-Platte überführt. Dieser Vorgang wurde 24-mal wiederholt und die 96-Well-Platte für 5 min im Brutschrank inkubiert. Es wurden vorbereitete 24-Well-Platten, in der jede Vertiefung Feederzellen und 1,5 ml ES-Zellmedium enthielt, beschriftet. Von diesen Platten wurden mit einer Pipette (Pipetman, Gilson) ca. 50 µl Medium aus einem Well entnommen und damit durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren ein ES-Zellkon in seiner Vertiefung der 96-Well-Platte vereinzelt. Es wurde darauf geachtet, dass kein Schaum entstand und die Pipettenspitze nicht den Boden der 96-Well-Platte berührte. Das zellhaltige Medium wurde spiralförmig in die entsprechende Vertiefung der 24-Well-Platte pipettiert. Dieser Vorgang wurde 24-mal wiederholt und die Platte in den Brutschrank überführt. Am zweiten Tag wurde das ES-Zellmedium dieser Platten gewechselt.

2.3.4 Einfrieren von ES-Zellen

Am dritten Tag nach dem Picken der ES-Zellklone wurden diese ES-Zellen vereinzelt und in Aliquots weggefroren. Dazu wurden die 23 Platten nacheinander wie folgt behandelt: Das Medium der 24-Well-Platten wurde abgesaugt, die Zellen 2-mal mit je 1,5 ml PBS-Puffer gewaschen und in jedes Well zwei Tropfen Trypsin-EDTA-Lösung gegeben. Die Platte wurde dann für 5 min im Brutschrank gelagert. Anschließend wurde in jedes Well 1 ml Einfriermedium bestehend aus 70 % ES-Zellmedium (ohne LIF), 20 % FBS und 10 % DMSO gegeben. Mit einer 1000 µl Pipette (Pipetman, Gilson), die auf 700 µl eingestellt war, wurden die Zellen durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Dabei wurde darauf geachtet keinen Schaum entstehen zu lassen und nicht den Boden des Wells zu berühren. 700 µl dieser Zellsuspension wurden in eine 2 ml Kryoröhre überführt und dieses auf Trockeneis gestellt. So wurde mit allen Wells der 24-Well-Platte verfahren und am Ende alle Vertiefungen mit ES-Zellmedium, welches G 418 und 0,5 x LIF enthielt, bis kurz unter den Rand aufgefüllt. Diese Platte wurde dann in den Brutschrank zurückgestellt und am nächsten Tag das Medium durch ES-Zellmedium, mit G 418 und 0,5 x LIF, ersetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen in den Wells lysiert, in denen sich das Medium aufgrund hoher Zelldichte gelb verfärbt hatte. In Wells, in denen sich das Medium noch nicht verfärbt hatte, wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden 2-mal mit je 1,5 ml PBS-Puffer gewaschen und in jedes Well wurden zwei Tropfen Trypsin-EDTA-Lösung gegeben. Die Platte wurde dann für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 1 ml ES-Zellmedium, mit G 418 und 0,5 x LIF, zugegeben und die Zellen durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Wenn sich das Medium der erneut trypsinierten Zellen gelb verfärbt hatte (bzw. spätestens nach drei Tagen) wurden die Zellen lysiert.

2.3.5 Lyse von ES-Zellen und Präparation von ES-Zell DNA

Zur Vorbereitung der Lyse der ES-Zellen wurde das Medium abgesaugt und pro Well 0,5 ml Lyseansatz zugegeben. Die Platten wurden dann für 16 h in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert und im Anschluss die DNA gefällt. Dazu wurden 0,5 ml Isopropanol in jedes Well gegeben und die Platten 3-4 h im Kühlraum bei 4 °C und anschließend 1-2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler moderat geschwenkt, bis die DNA als Flocke oder netzartige Struktur in den Wells sichtbar wurde. Die DNA wurde dann mithilfe einer 200 µl Pipettenspitze in ein entsprechend beschriftetes Reaktionsgefäß, welches 150 µl TE-Puffer

enthielt, überführt und dort 30 min quellen gelassen, bevor die Pipette aus dem Reaktionsgefäß entfernt wurde. Danach wurde die DNA in einem Heizschrank (Function Line, Heraeus) bei 50 °C für 24 h gelöst und währenddessen 3-mal über einen Reaktionsgefäßständer (VWR) geratscht. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis sich die DNA gut pipettieren ließ, wobei die Inkubationsdauer bei 50 °C entsprechend angepasst wurde. Um die Qualität der präparierten DNA zu überprüfen wurde sie stichprobenartig photometrisch vermessen und je 3 µl auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. War die DNA nicht degradiert, war dort nur eine Bande oberhalb des DNA-Markers erkennbar. Wenn sich unterhalb dieser Bande wenig degradierte genomische DNA zeigte, war die DNA zum Verdau für den Southern Blot geeignet.

Proteinase K		Trypsin-EDTA-Lösung	
Proteinase K	10 mg	10 x Trypsin-EDTA-	5 ml
(Roche)		Lösung (Gibco)	
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 µl	H ₂ O	<i>ad</i> 50 ml
Lyse-Puffer pH 8,5		Lyseansatz	
Tris	12,44 g	Lyse-Puffer pH 8,5	49,5 ml
EDTA	1,86 g	Proteinase K	0,5 ml
SDS	2 g	(10 mg / ml, Roche)	
NaCl	11,69 g		
Salzsäure (37 %)	<i>qs</i>		
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml		
10 x PBS-Puffer		1 x PBS-Puffer	
NaCl	80,06 g	10 x PBS-Puffer	50 ml
KCl	2,01 g	H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	14,42 g		
KH ₂ PO ₄	2,04 g		
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml		

2.4. Biopsie und Gewebeverdau

Um DNA für Genotypisierungszwecke zu präparieren, wurden kleine Mengen Gewebsbiopsien der Zehe oder des Schwanzes der Mäuse entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu diesen Gewebeproben wurde 50 µl eines Verdauansatzes gegeben und über 16 h bei 55 °C und 300 rpm in einem Thermomixer geschüttelt. Ein Leerwert als Kontrolle wurde analog behandelt. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K (PCR-Grade 5 ml Solution, Roche) im Verdau durch Erhitzen im Heizblock auf 99 °C inaktiviert. Das so erhaltene Lysat konnte bei 4 °C gelagert werden. Ein Vorteil dieser Methode war es, dass ein Teil dieses Ansatzes für eine Genotypisierungs-PCR verwendet werden konnte, allerdings war dabei die DNA aufgrund suboptimaler Lysebedingungen stark degradiert. Somit eignet sich diese Methode nicht für eine Präparation genomischer DNA von hoher Qualität.

Verdauansatz	
Lyse-Puffer	5 µl
Proteinase K	1 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

2.5 Standardgenotypisierungsansatz für die PCR

Um die Nachkommen der Chimären und der HCN2-FEA-Knockin Mäuse genotypisieren zu können, wurde eine Genotypisierungsstrategie konzipiert (3.2.9). Die PCR wurde mit der Taq-Polymerase durchgeführt, als Primer wurden die Oligodesoxynukleotide HCN2Genolxpfor und HCN2Genolxprev unter den angegebenen Bedingungen verwendet. Es wurden im Anschluss 12,5 µl der PCR auf ein 2 % analytisches Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

PCR-Standardreaktionsansatz

(Taq-Polymerase, MP Biomedicals):

Gewebeverdau	3 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,25 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,25 µl
dNTPs (1,25 mM)	4 µl
10 x Taq Puffer	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 25 µl

Reaktionsbedingungen (Taq-Polymerase, MP Biomedicals):

Initiale Denaturierung 95 °C 5 min

Denaturierung	95 °C	30 s	35 Zyklen
<i>Annealing</i>	59 °C	30 s	
Elongation	72 °C	40 s	
Finale Polymerisation	72 °C	3 min	
Aufbewahrung	10 °C	∞	

3. ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit war es eine Knockin Mauslinie zu generieren, in der im Organverbund die Bedeutung der Koaktivierung der HCN2-Kanals durch cAMP untersucht werden kann.

3.1 Funktionelle Untersuchung von cAMP insensitiven HCN2-Kanalmutanten

Zu Beginn wurde die Kanalmutante R591E, T592A (Much B., 2003), bei der die Aminosäuren Arginin an der Position 591 zu Glutaminsäure und Threonin an der Position 592 zu Alanin in der CNBD mutiert sind, untersucht (Abbildung 6).

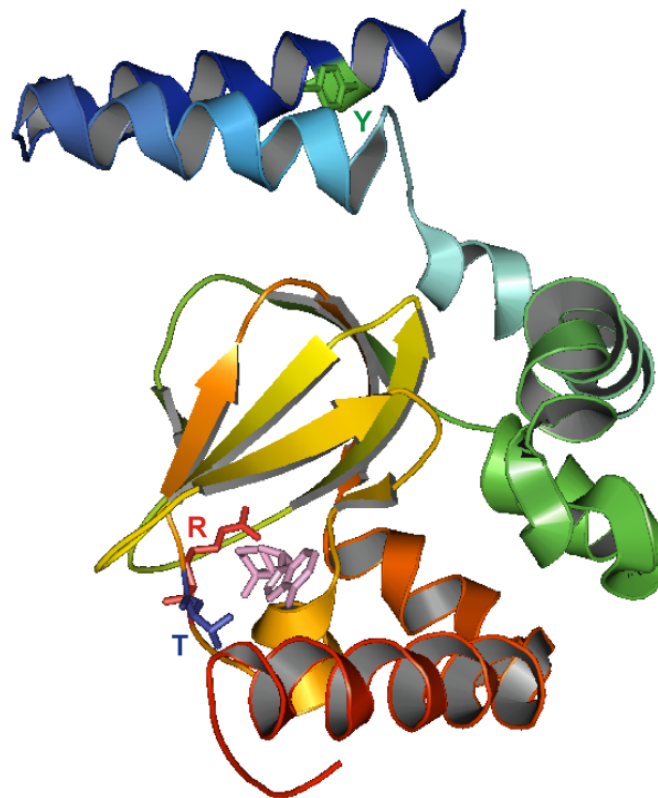


Abbildung 6: Die Kristallstruktur des C-Terminus des HCN2-Kanals. Gezeigt ist der C-Terminus des HCN2-Ionenkanals, an dessen CNBD cAMP gebunden hat. Hervorgehoben sind die in der CNBD für die cAMP-Bindung wichtigen Aminosäuren Arginin 591 (R, rot) und Threonin 592 (T, blau). Im C-Linker ist die Aminosäure Tyrosin (Y, grün) an der Position 449 dargestellt. (Modifiziert nach (Zagotta et al. 2003))

Durch diese Mutationen wird die CNBD so verändert, dass der HCN2-Kanal nicht mehr durch cAMP koaktiviert werden kann. Dabei könnte das Problem auftreten, dass eine Aktivierung des Kanals erst bei sehr negativer Membranspannung erfolgt. Da *in vivo* diese Membranspannungswerte nicht erreicht werden, wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der HCN2-Kanäle unter physiologischen Bedingungen sehr gering. Dabei besteht die Gefahr, dass es sich bei diesen Tieren um einen funktionellen Knockout des Kanals handeln könnte. Die elektrophysiologischen Voruntersuchungen der Kanalmutante R591E, T592A in HEK293-Zellen bestätigten, dass ihre Aktivierungskurve sehr weit in Richtung zu negativen Potentialen verschoben wird (Abbildung 7, B).

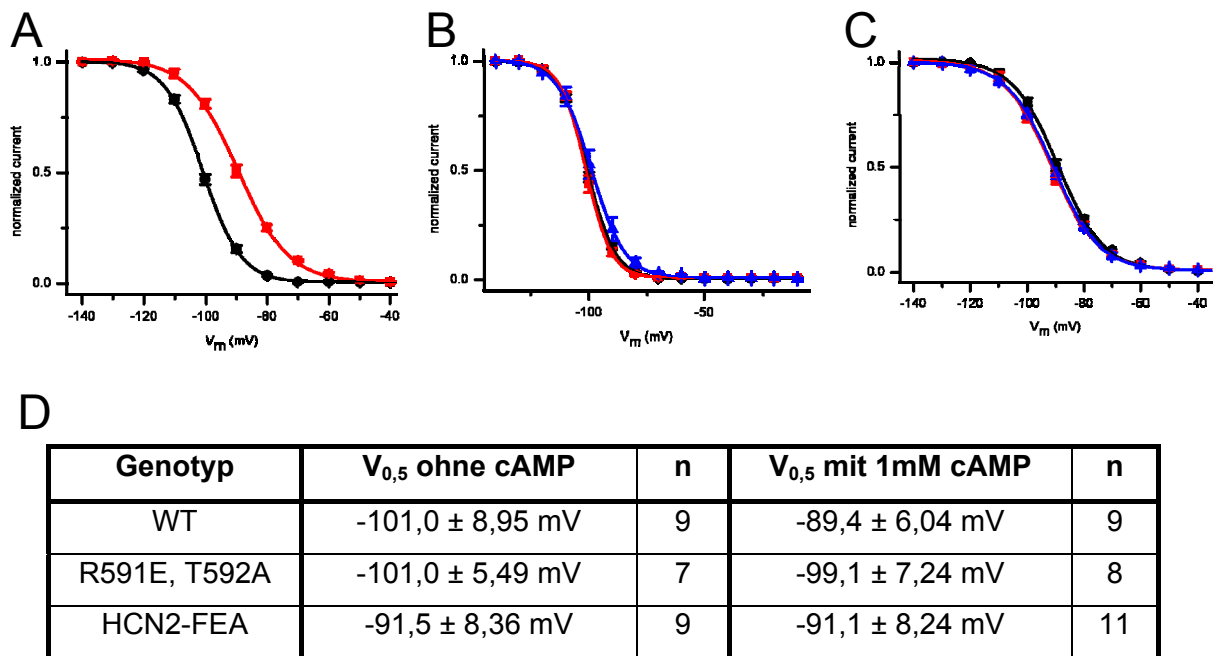


Abbildung 7: Die elektrophysiologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals und dessen Mutanten.

(A) Gezeigt sind die Aktivierungskurven des WT HCN2-Kanals in Anwesenheit (rot) und Abwesenheit (schwarz) von cAMP. Die Aktivierungskurve des Kanals wird bei Anwesenheit von cAMP um 11,6 mV hin zu positiveren Werten verschoben. (B) Dargestellt ist die Aktivierungskurve des WT HCN2-Kanals (schwarz) in Abwesenheit von cAMP. Des Weiteren werden die Aktivierungskurven der HCN2-Kanalmutante R591E, T592A in Abwesenheit (rot) und in Anwesenheit von cAMP (blau) gezeigt. Es ist ersichtlich, dass die HCN2-Kanalmutante R591E, T592A nicht mehr durch cAMP koaktiviert wird und sich in Gegenwart von cAMP wie der WT HCN2-Kanal in Abwesenheit von cAMP verhält. (C) Aktivierungskurven der HCN2-Kanalmutante HCN2-FEA (Y449F, R591E, T592A) ohne (rot) und mit (blau) cAMP im Vergleich zum WT-Kanal in Anwesenheit von cAMP (schwarz). Die HCN2-FEA-Kanalmutante verhält sich in Abwesenheit von cAMP wie der WT HCN2-Kanal in Anwesenheit von cAMP. (D) Tabelle der $V_{0,5}$ des WT HCN2-Kanals und der beiden Kanalmutanten. (Modifiziert nach Zong X., 2010 (unpublizierte Daten))

Daher sollte durch ein zusätzliches Mutieren einer weiteren Aminosäure des HCN2-Kanals, die Aktivierungskurve wieder in den physiologischen Bereich verschoben werden. Dies sollte durch die Mutation der Aminosäure Phenylalanin an der Position 449 zu Threonin im C-Linker des Kanals bewerkstelligt werden (Abbildung 6). Durch zielgerichtete Mutagenese wurde die Mutation Y449F in die cDNA der Kanalmutante R591E, T592A eingefügt (Abbildung 8). Die funktionelle Charakterisierung dieser HCN2-FEA-Kanalmutante (Y449F, R591E, T592A) zeigte, dass deren Aktivierungskurve wieder im physiologischen Membranspannungsbereich liegt (Abbildung 7, C).

Die halbmaximale Aktivierung ($V_{0,5}$) der HCN2-FEA-Kanalmutante liegt bei Abwesenheit von cAMP dem Wert der $V_{0,5}$ des WT-Kanals bei Anwesenheit von cAMP sehr nahe (Abbildung 7D). Somit verhält sich die HCN2-FEA-Kanalmutante wie ein permanent maximal durch cAMP koaktivierter WT HCN2-Kanal. Im Unterschied zum WT-Kanal wird sie jedoch nicht mehr durch unterschiedliche intrazelluläre cAMP Konzentrationen beeinflusst.

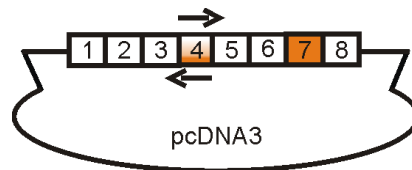


Abbildung 8: Schematische Darstellung der cDNA für die HCN2-FEA-Kanalmutante. Durch gezielte Mutagenese im Exon 4 wurde der Kanalmutane R591E, T592A das Codons 449 von Y zu F mutiert.

3.2 Generierung einer Knockin Mauslinie

Um die veränderte Information für die HCN2-FEA-Kanalmutante stabil in das Genom einer Mauslinie einzufügen, fand eine Knockin Gentargeting Strategie Anwendung (Hanks et al. 1995; Talts et al. 1999; Wang et al. 1996). Durch homologe Rekombination eines Targetingkonstrukts (Martin 1981; Smithies et al. 1985) in das Genom totipotenter muriner embryonaler Stammzellen (Evans and Kaufman 1981) wurde dort die Information für den WT HCN2-Kanal durch die der HCN2-FEA-Kanalmutante ersetzt (Abbildung 10). Die embryonalen Stammzellen wurden selektioniert (Thomas and Capecchi 1987), mittels Southern Blot, PCR und Sequenzanalyse identifiziert und charakterisiert. Die Zellklone, welche das Konstrukt korrekt integriert hatten, wurden expandiert und in WT-Blastozysten

der Maus injiziert, die dann scheinchwangeren Mäusen implantiert wurden (Talts et al. 1999). Die daraus entstandenen Chimären dienen zur weiteren Verpaarung und somit zur Generierung der Knockin Mauslinie.

3.2.1 Planung des Targetingkonstrukts

Um die Mutationen stabil in das Genom der ES-Zellen einzufügen wurde ein Targetingkonstrukt kloniert. Dieses Konstrukt musste in den entsprechenden Exons die Mutationen für HCN2-FEA (Y449F, R591E, T592A) tragen. Im Exon 4 wurde für die Mutation Y449F das Codon 449 von TAC zu TTC durch zielgerichtete Mutagenese geändert. Im Exon 7 wurde für die Mutationen R591E und T592A das Codon 591 von CGT zu GAA und das Codon 592 von ACG in GCG geändert. Des Weiteren musste das Konstrukt einen 3'- sowie 5'-homologen Bereich zu dem HCN2-Gen sowie alle dafür notwendigen Exons und Introns besitzen um eine möglichst vollständige Integration des Konstrukts in das Genom zu gewährleisten (Rajewsky et al. 1996; Smithies et al. 1985; Thomas and Capecchi 1987). Für die Überprüfung der richtigen Integration mittels Southern Blot Analyse war es notwendig, artifizielle Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen vor und nach der ACN-Kassette einzufügen. Um den Vektor für die Elektroporation zu linearisieren wurde am 3'-Ende die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Asc I eingefügt.

3.2.1.1 ACN-Kassette

Zur Positivselektion der ES-Zellen nach der Elektroporation enthielt das Konstrukt ein Neomycin-Resistenzgen (Neomycin-Phosphotransferase) (Mansour et al. 1988; Thomas and Capecchi 1987). ES-Klonen, in deren Genom das Konstrukt integriert hatte, wurde so in Geneticin (G 418) haltigem Medium ein Wachstum ermöglicht. Hierfür wurde eine sogenannte ACN-Kassette in das Konstrukt eingefügt (Bunting et al. 1999), die das nötige Resistenzgen für G 418 unter der Kontrolle des RNA-Polymerase II Promotors der Maus enthält. Diese Kassette wird von zwei unidirektionalen loxP-Sequenzen flankiert, über die die Kassette aus dem Genom mithilfe der Cre-Rekombinase entfernt werden kann (Gu et al. 1994; Orban et al. 1992). So können etwaige negative Effekte der ACN-Kassette, wie beispielsweise ein negativer Einfluss auf die Expression benachbarter Gene, durch das Verbleiben von artifizieller DNA im Genom verhindert werden (Rajewsky et al. 1996). Die

cDNA der Cre-Rekombinase ist mit einem artifiziellen Exon versehen um eine Aktivität in Prokaryoten, welche zum Vervielfältigen von Plasmid DNA verwendet werden, auszuschließen. Die Information für die Cre-Rekombinase unterliegt der Kontrolle eines in Spermien aktiven tACN-Promotors, sodass in diesen Zellen die Cre-Rekombinase exprimiert wird und die Kasette sich dort selbst aus dem Genom entfernt („*Self Exciser*“) (Abbildung 9). Nach erfolgter Exzision verbleibt an dieser Stelle eine loxP-Sequenz und die artifiziellen Schnittstellen für die Southern Blot Strategie im Genom. Die ACN-Kasette wurde von Prof. Dr. Mario Capecchi zur Verfügung gestellt (University of Utha, USA).

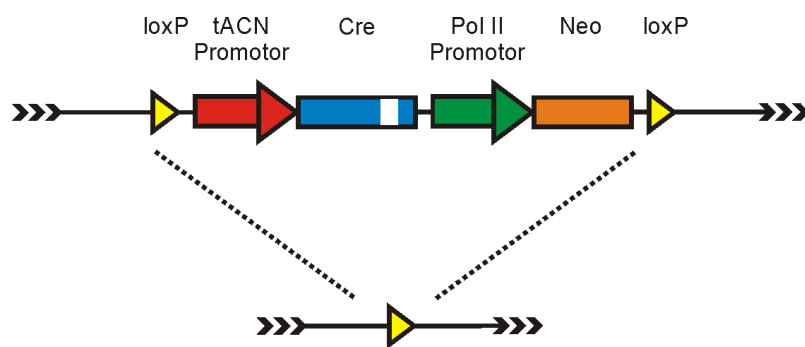


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ACN-Kassette. Die loxP-Sequenzen, welche durch die Cre-Rekombinase erkannt, gespalten und neu verknüpft werden, flankieren die ACN-Kassette (gelbe Dreiecke). Der in Spermien aktive tACN-Promotor (Roter Pfeil) steuert die Expression der Cre-Rekombinase. Die Information für die Cre-Rekombinase wird durch ein blaues Rechteck dargestellt. Sie enthält ein artifizielles Intron (weißer Streifen). Das Neomycin-Resistenzgen für die Positivselektion (orangefarbenes Rechteck) unterliegt der Kontrolle des murinen RNA Polymerase II Promotors (grüner Pfeil). (Modifiziert nach (Bunting et al. 1999))

3.2.1.2. Planung der Southern Blot Strategien

Um nach erfolgter Rekombination des Targetingkonstrukts (Abbildung 10) dessen korrekte Integration zu überprüfen und um Fehlintegrationen auszuschließen, wurden Southern Blot Strategien ausgearbeitet und experimentell überprüft.

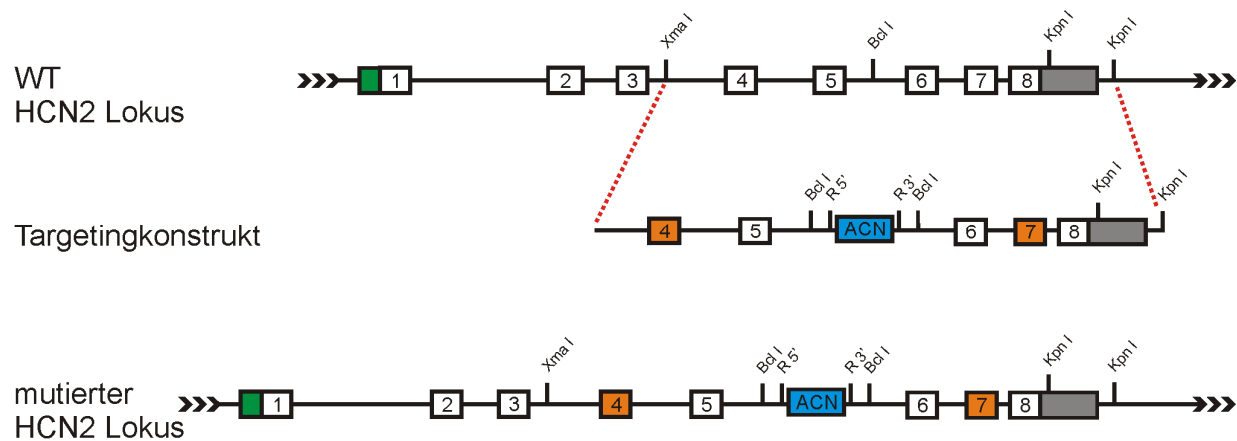


Abbildung 10: Schematische Darstellung des HCN2-Allels vor und nach der Rekombination. Dargestellt ist der WT-Lokus des murinen HCN2-Gens (oben) und das Allel nach erfolgter Rekombination (unten) des Targetingkonstrukts. Die 5'-UTR ist als grünes Rechteck, die 3'-UTR ist als graues Rechteck und die Exons 1-8 sind als weiße Rechtecke dargestellt. Die mutierten Exons werden durch ein oranges Rechteck, die ACN-Kassette durch ein blaues Rechteck dargestellt. Die artifiziell eingefügten Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme für die Southern Blot Strategie sind als R5' bzw. R3' gekennzeichnet.

Grundlage der Strategien war es, mit dem Targetingkonstrukt artifizielle Restriktionsschnittstellen in den HCN2-Lokus mitzuintegrieren, sodass über den Verdau mit entsprechenden Enzymen DNA-Fragmente mit definiert unterschiedlichen Längen aus dem WT- und KI-Allel entstehen. Mithilfe von DNA-Sonden, die außerhalb des homologen Bereiches des Targetingkonstrukts liegen, können dann diese Fragmente aufgrund ihrer Länge unterschieden werden. Um mögliche Mehrfachintegrationen auszuschließen wurde ähnlich verfahren, wobei die DNA-Sonden hier in dem für die Positivselektion verantwortlichen Neomycin-Resistenzgen lagen. Mit dieser Strategie konnte eine Mehrfachintegration des Konstrukts durch das Detektieren von nur einer definierten Bande ausgeschlossen werden. Zu Beginn wurden für diese Strategien geeignete Restriktionsendonukleasen gesucht, die durch einen Verdau der DNA geeignete Banden erzeugen. Für den 5'-Bereich wurden die Restriktionsendonukleasen EcoR I und EcoR V gewählt. Für den 3'-Bereich sollten BamH I und EcoR I verwendet werden. Für die Prüfung auf eine mögliche Mehrfachintegration des Targetingkonstrukts wurden Afl II und Sac II gewählt. Vor der endgültigen Planung des Targetingvektors wurden die Strategien an genomischer WT ES-Zell DNA getestet. Somit konnte festgestellt werden ob die notwendigen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen im Genom vorhanden waren. Dies war notwendig um eventuelle Unterschiede dieser Erkennungssequenzen in der verwendeten DNA im Vergleich zu der verwendeten Referenzsequenz einer Internetdatenbank (www.ensembl.org Transcript ID: ENSMUST00000099513) auszuschließen. Außerdem konnte so die Effizienz der Enzyme

sowie die Spezifität der Sonden überprüft werden. Die 5'- und 3'-Sonde wurden mittels PCR aus genomischer WT ES-Zell DNA amplifiziert. Zur Gewinnung der internen Sonde, die sich gegen das Neomycin-Resistenzgen richtet (Neo-Sonde), wurde das Plasmid, das die ACN-Kassette enthielt, verwendet (Abbildung 11).

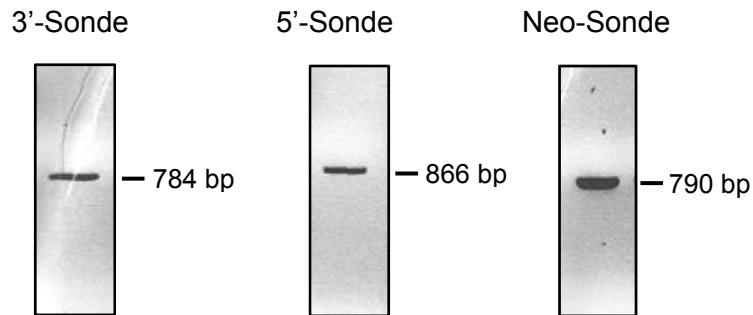


Abbildung 11: Gewinnung der Sonden für den Southern Blot. Gezeigt ist die 3'-Sonde mit 784 bp, die 5'-Sonde mit 866 bp und die Neo-Sonde mit 784 bp. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte über ein Agarosegel und anschließender Gelextraktion. Es wurde je 1 µl des Eluats auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen.

3.2.2 Test der Southern Blot Strategien

3.2.2.1 Test der Strategie für den 3'- Bereich

Um die richtige Integration des Targetingkonstrukts in den 3'-Bereich des HCN2-Allels zu prüfen, wurden die Enzyme BamH I und EcoR I gewählt (Abbildung 12). In einem Southern Blot Experiment konnten die Banden mit der vorher berechneten Größe erfolgreich detektiert werden (Abbildung 15). Somit waren die Enzyme sowie die 3'-Sonde für diese Strategie geeignet.

Wildtyp

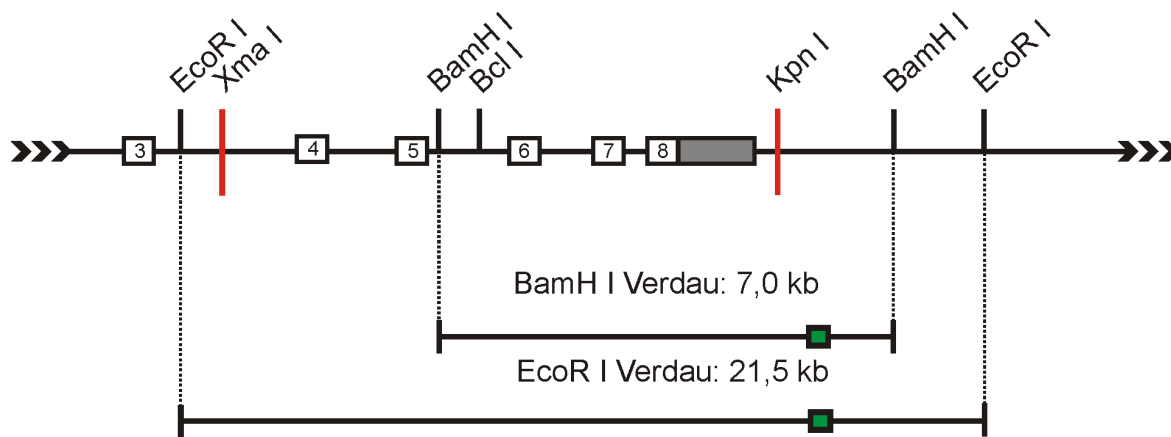


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Southern Blot Strategie für den WT 3'-Bereich.

Die Roten Balken repräsentieren die Grenzen der Homologie des Targetingkonstrukts. Die Exons des HCN2-Gens werden durch schwarze Rechtecke, die 3'-UTR wird als graues Rechteck symbolisiert. Abgebildet sind die Schnittstellen der 3'-Southern Blot Strategie, für die BamH I und EcoR I gewählt wurden. Die DNA-Fragmente, welche durch einen Verdau erzeugt werden, sind durch schwarze Linien mit Größenangaben dargestellt. Die außerhalb der Homologie des Targetingkonstrukts liegende 3'-Sonde wird als grünes Rechteck symbolisiert.

3.2.2.2 Test der Strategie für den 5'-Bereich

Um die korrekte Integration des 5'-Bereichs des Targetingkonstrukts in den HCN2-Lokus zu prüfen, wurden die Enzyme EcoR I und EcoR V getestet (Abbildung 13). Dazu wurde ein Southern Blot Experiment durchgeführt. In diesem konnten die vorher berechneten Banden, die ein Restriktionsverdau mit diesen Enzymen aus WT DNA erzeugt, erfolgreich detektiert werden (Abbildung 15). Somit waren die Sonde sowie die Restriktionsenzyme zur Überprüfung des 5'-Bereichs geeignet.

Wildtyp

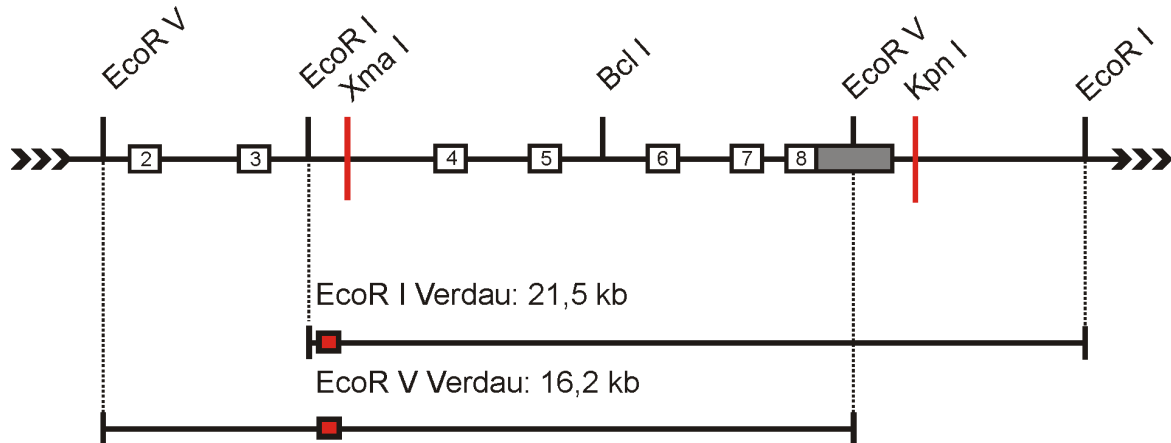


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Southern Blot Strategie für den WT 5'-Bereich.

Die Grenzen der Homologie des Targetingkonstrukts sind als rote Balken, die Exons des HCN2 Gens sind als schwarze Rechtecke dargestellt, die 3'-UTR als graues Rechteck. Des Weiteren gezeigt sind die Schnittstellen der 5'-Southern Blot Strategie, für die EcoR I und EcoR V gewählt wurden. Die DNA-Fragmente, welche durch einen Verdau erzeugt werden, sind durch schwarze Linien mit Größenangaben gekennzeichnet. Die außerhalb der Homologie des Targetingkonstrukts liegende 5'-Sonde ist als rotes Rechteck abgebildet.

3.2.2.3 Test der Strategie zur Prüfung auf Mehrfachintegration

Um eine Mehrfachintegration des Targetingvektors in andere Loci auszuschließen musste mit einer internen Sonde nach weiteren Integranten im Genom gesucht werden. Sofern die Integration des Konstruktes nur einmal stattgefunden hat, wird dies durch das Auftreten von nur einer Bande mit definierter Größe im Southern Blot angezeigt. Hierfür müssen die Enzyme innerhalb des Targetingkonstruktes und außerhalb des homologen Bereiches des Targetingkonstruktes schneiden. Als Restriktionsenzyme für diese Strategie wurden Afl II und Sac II gewählt (Abbildung 14). Zur Detektion konnten nur die schon erwähnte 5'- und 3'-Sonde verwendet werden, da in der verwendeten genomischen WT DNA noch kein Targetingkonstrukt integriert war. Durch dieses Experiment konnte überprüft werden, ob sich die Erkennungssequenzen für die gewählten Restriktionsenzyme auch tatsächlich im Genom der ES-Zellen befanden. In dem entsprechend durchgeführten Southern Blot Experiment konnten die jeweiligen Banden nachgewiesen werden (Abbildung 15).

Wildtyp

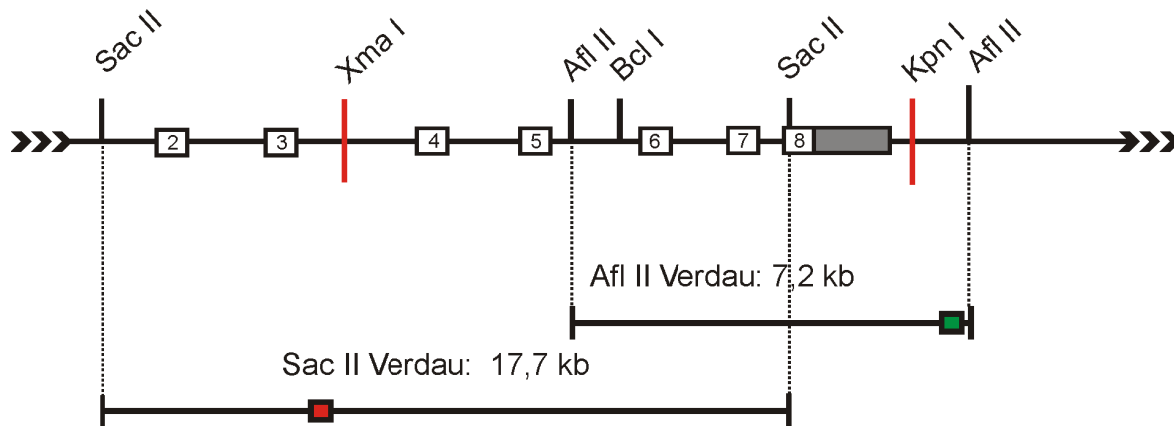


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Tests der Southern Blot Strategie zur Prüfung auf Mehrfachintegration (Neo-Strategie). Die schwarzen Rechtecke symbolisieren die Exons des WT HCN2-Gens, das graue Kästchen die 3'-UTR. Der Beginn und das Ende der Homologie des Targetingkonstrukts sind als rote Balken dargestellt. Die DNA-Fragmente, die durch den Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen entstehen, sind durch schwarze Balken mit Größenangaben gekennzeichnet. Das rote Rechteck repräsentiert die 5'-Sonde und das grüne Kästchen die 3'-Sonde, welche zur Detektion der DNA-Fragmente verwendet wurden.

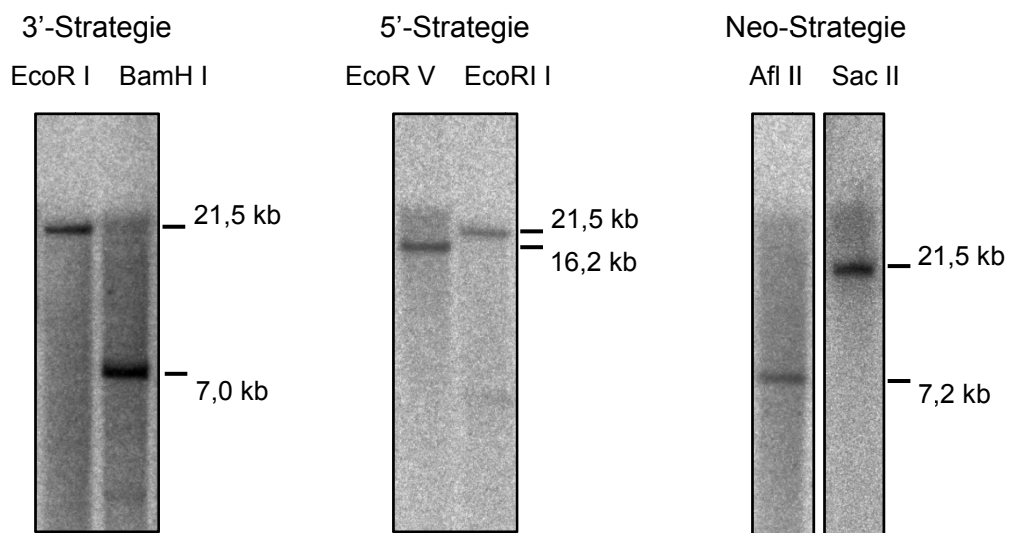


Abbildung 15: Der Test der Southern Blot Strategien. Dargestellt sind die autoradiographisch ausgewerteten Membranen der 3'-, 5'- und der Neo-Strategie. In den durchgeführten Southern Blots konnten die vorher berechneten Banden der 3'-Strategie für den Verdau mit BamH I bei 7,0 kb und EcoR I bei 21,5 kb detektiert werden. Auch die Membran der 5'-Strategie zeigte die für den Verdau mit EcoR I bei 21,5 kb und für EcoR V bei 16,2 kb berechnete Bande. In dem durchgeführten Test der Neo-Strategie konnten ebenfalls mit der 5'- bzw. 3'-Sonde die vorher berechneten Banden für den Verdau mit Afl II bei 7,2 kb und für Sac II bei 17,7 kb detektiert werden. Somit waren die Southern Blot Strategien und die für den Verdau notwendigen Enzyme für das Gentargeting geeignet.

3.2.3 Klonierung des Targetingkonstrukts

Nachdem die geplanten Restriktionsendonukleasen in den Southern Blot Experimenten erfolgreich getestet wurden, konnte der Targetingvektor vollständig geplant werden (Abbildung 16).

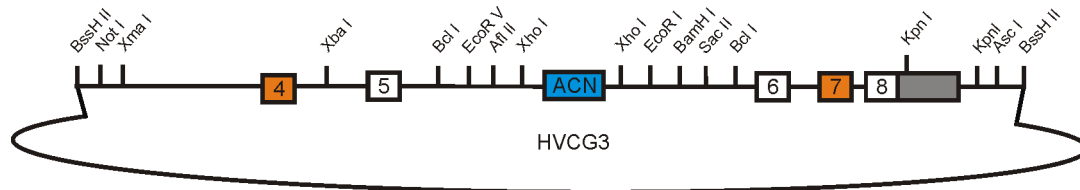


Abbildung 16: Die schematische Darstellung des Targetingvektors. Gezeigt ist das Targetingkonstrukt für den HCN2-Kanal im HVC3 Vektor. Die Grenzen der 5'-Homologie wird durch die Schnittstelle Xma I, die der 3'-Homologie durch die Kpn I Schnittstelle nach der 3'-UTR (graues Rechteck) gebildet. Die Exons sind durch weiße Rechtecke symbolisiert, die orangen Rechtecke zeigen die mutierten Exons 4 (Y449F) und 7 (R591E, T592A) an. Die entsprechenden Introns sind als schwarze Linien zwischen den Exons symbolisiert. Die ACN-Kassette, welche die Positivselektion der ES-Zellen ermöglicht, wird als blaues Rechteck im Intron 5 dargestellt. Direkt neben der ACN-Kassette befinden die 5'- sowie die 3'-Schnittstellen für die Southern Blot Strategie.

Dieser umfasste die Exons 4 bis 8 des HCN2-Gens, die dazugehörigen Introns und die Mutationen für HCN2-FEA. Als 5'-Homologiegrenze wurde die Xma I Schnittstelle im Intron 3 gewählt. Die 3'-Homologiegrenze bildete die zweite Kpn I Schnittstelle nach dem Stopcodon des Gens. Die ACN-Kassette mit den flankierenden Schnittstellen für die Southern Blot Strategie wurden in das Konstrukt über die Schnittstelle Bcl I in das Intron 4 kloniert. Bei der Wahl der Schnittstelle war es notwendig, die ACN-Kassette möglichst nah an die Mutationen im Exon 4 und 7 zu platzieren, um einen ausreichenden Selektionsdruck während der Positivselektion auf diese Mutationen zu gewährleisten. Die Schnittstelle sollte auch in einem möglichst großen Intron und soweit wie möglich von Intron / Exon Grenzen entfernt liegen um einen Einfluss auf das Spleißen der RNA zu minimieren. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass das Einbringen von Fremd DNA an der Bcl I Schnittstelle nicht einen möglichen „Branch Point“ zerstört, welcher essentiell für das Spleißen der prä-mRNA ist. Hierzu wurde zum Einen geprüft, ob die Verwendung der Bcl I Schnittstelle die Sequenz CTGA, die einen möglichen Branch Point anzeigt (Keller and Noon 1984), verändern würde. Des Weiteren ist ein möglicher Branch Point meist in der Nähe des 3'-Endes eines Introns lokalisiert (Keller and Noon 1984), die Bcl I Schnittstelle ist jedoch relativ weit (742 bp) vom

3'-Ende des Introns 5 entfernt. Da diese beiden Punkte ausgeschlossen werden konnten, sollte es zu keinen Fehlern beim Spleißen der prä-mRNA durch die Verwendung der Bcl I Schnittstelle kommen. Die ACN-Kassette wurde in umgekehrter Orientierung in das Konstrukt eingefügt um etwaige Effekte dieser Kassette auf die Expression des affektierten Gens zu vermeiden. So könnte es aufgrund des künstlichen Introns innerhalb der ACN-Kassette zu Spleißfehlern bei der Bildung der mRNA des HCN2-Kanals kommen. Des Weiteren könnte es beim Ablesen der Information für den HCN2-Kanal zu einer ungewollten Expression der ACN-Kassette kommen. Zusätzlich wurden in den flankierenden Bereich der ACN-Kassette geeignete Schnittstellen eingefügt, mit denen die erfolgreiche Rekombination durch Southern Blot Experimente überprüft werden kann. Um den Vektor vor der Elektroporation in die embryonalen ES Zellen zu linearisieren, wurde Asc I verwendet. Die Erkennungssequenz für diese Restriktionsendonuklease war nur einmal im gesamten Vektor vorhanden. Als Vektor, in dem das Konstrukt assembliert werden sollte, wurde der Klonierungsvektor pBlueskript gewählt, dessen MCS für bestimmte Klonierungsschritte modifiziert wurde. Zu Beginn der Klonierung des Targetingkonstruktes wurden alle benötigten DNA-Fragmente erzeugt.

3.2.3.1 Klonierung von Vektoren mit individueller MCS

Da der pBlueskript Vektor in seiner MCS nicht über die benötigten Erkennungssequenzen zur Durchführung der geplanten Klonierung verfügte, wurde seine MCS durch einen Verdau mit BssH II entfernt und durch eine individuell konstruierte MCS ersetzt. Daraus entstanden die beiden neuen Vektoren HVCG3 und HVCG4 mit veränderter MCS (Abbildung 17).

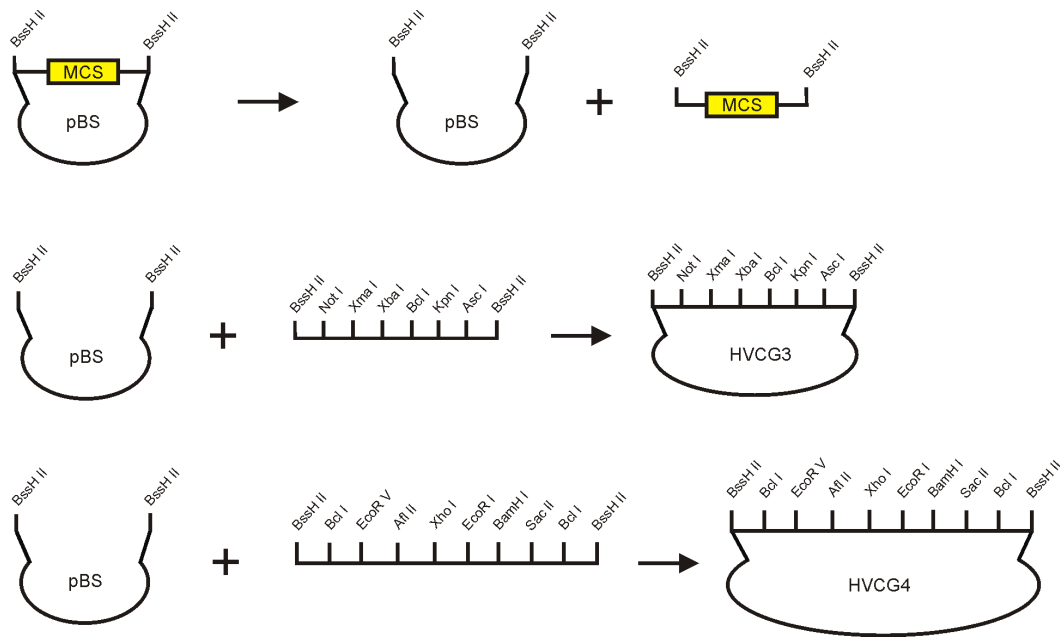


Abbildung 17: Die Herstellung von Vektoren mit modifizierter MCS. Dargestellt ist die Herstellung von Vektoren, die über eine MCS mit individuellen Erkennungsequenzen für Restriktionsendonukleasen verfügen. Dazu wurde aus dem pBlueskript (pBS) Vektor die MCS (gelbes Rechteck) über einen Verdau mit BssH II entfernt. Über die Schnittstellen BssH II wurden dann je zwei neue Fragmente mit allen für die weiteren Schritte notwendigen Erkennungsssequenzen in das Rückgrat des pBlueskript Vektors eingefügt. So entstanden zwei neue Vektoren, die als HVC3 und HVC4 bezeichnet wurden.

3.2.3.2 Klonierung des 3'-Bereichs

Ein bereits vorhandener Targetingvektor für das HCN2-Gen enthielt schon den benötigten Teil des 3'-Bereichs sowie die Mutationen R591E und T592A (Eckert C., 2006). Zur Freisetzung der Neomycin-Resistenzkassette wurde der Vektor mit Not I verdaut und anschließend wieder religiert (Abbildung 18).

Die Sequenzanalyse zeigte, dass das Konstrukt fehlerfrei war. Mithilfe der Restriktionsendonukleasen Kpn I und Bcl I wurden zwei wichtige DNA-Fragmente aus diesem Vektor freigesetzt. Zuvor war es jedoch nötig, dieses Konstrukt in Methylase defiziente Bakterien zu transformieren, da die Bcl I Schnittstelle im *E. coli*-Bakterium einer dem Methylierung unterworfen ist. Durch die Methylierung ist die Restriktionsendonuklease Bcl I nicht in der Lage die DNA zu schneiden. Alle Plasmide, die mit Bcl I verdaut wurden, mussten somit zuvor in methylasedefizienten *E. coli*-Bakterien amplifiziert werden.

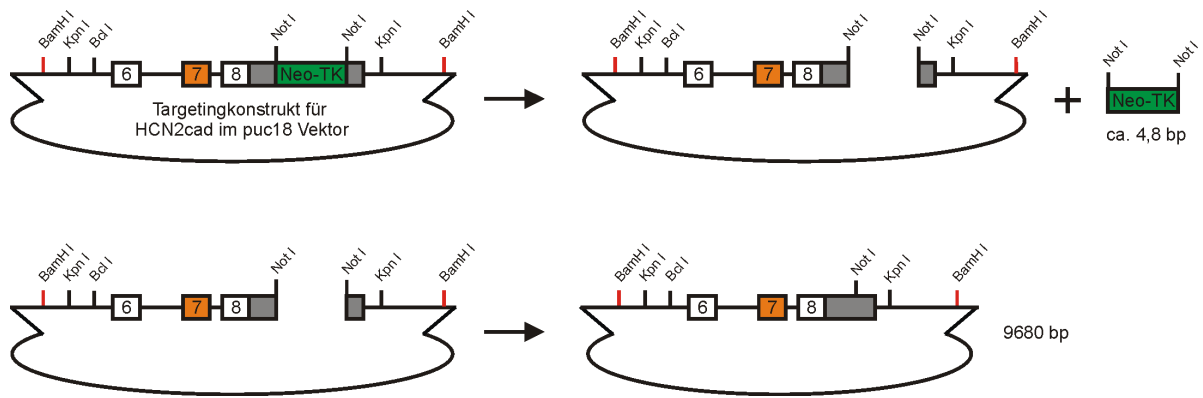


Abbildung 18: Die schematische Darstellung eines Targetingvektors für das HCN2-Gen im pUC18-Vektor. (Modifiziert nach Eckert C., 2006) Die 5'-Homologie- sowie die 3'-Homologiegrenze dieses Konstrukts bilden die beiden Schnittstellen BamH I, welche mit einem roten Balken dargestellt sind. Dieses Konstrukt enthielt den benötigten Teil des 3'-Bereichs für den neuen Targetingvektor. Um den 3'-Bereich dieses Konstrukts verwenden zu können, musste zuvor die Neomycin-Resistenzkassette (grünes Rechteck) in der 3'-UTR (graues Rechteck) über einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease Not I entfernt werden. Der Vektor wurde wieder religiert und konnte nun zur Gewinnung des 3'-Bereichs verwendet werden.

Der Verdau des Vektors lieferte ein Fragment von 811 bp des 3'-Bereichs sowie ein 3360 bp großes Fragment, welches einen Teil des Introns 5 sowie die Exons 6 bis 8 mit den dazwischen liegenden Introns umfasste (Abbildung 19).

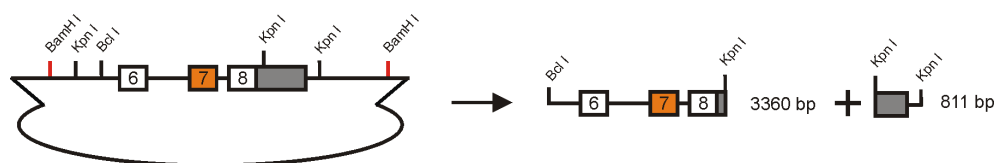


Abbildung 19: Die Gewinnung des 3'-Bereichs. Dargestellt ist der aus Abbildung 18 modifizierte Vektor. Über einen Verdau mit Bcl I und Kpn I konnten beide Fragmente, die zur Klonierung des 3'-Bereichs des neuen Targetingvektors benötigt wurden, freigesetzt werden.

Der HVCG3 Vektor wurde mit Bcl I und Kpn I geschnitten und das zuvor präparierte 3360 bp große Fragment, welches die Exons 6, 7 und 8 enthielt, eingefügt. Dieses Plasmid wurde mit Kpn I verdaut und das 811 bp große Stück des 3'-Bereichs in den Vektor ligiert (Abbildung 20).

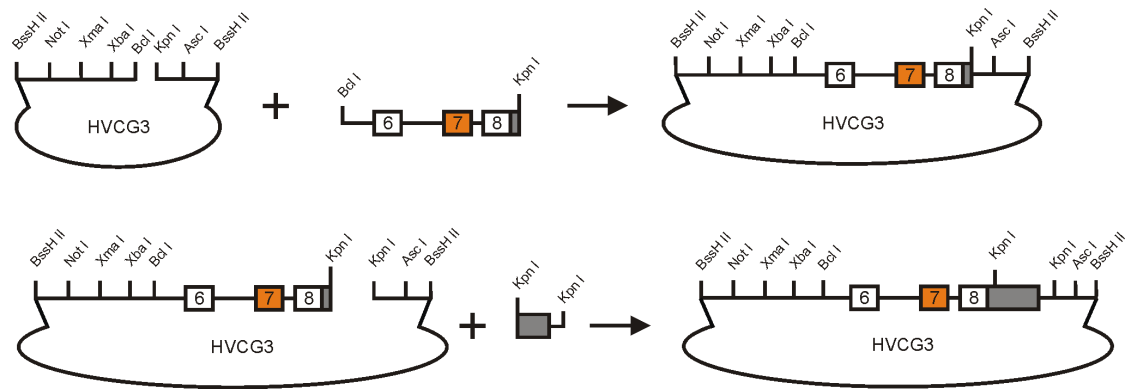


Abbildung 20: Der Aufbau des 3'-Bereichs. Gezeigt ist die Klonierung des 3'-Bereichs des Targetingkonstrukts. Dazu wurde der HVC3 Vektor mit Bcl I und Kpn I geschnitten und das Fragment, welches sich von der Bcl I Schnittstelle im Intron 5 bis zur ersten Kpn I Schnittstelle in der 3'-UTR (graues Rechteck) erstreckte, in den Vektor ligiert. Danach wurde dieses Plasmid mit Kpn I geschnitten und der letzte Teil des 3'-Bereichs eingefügt.

3.2.3.3 Klonierung des 5'-Bereichs

Ein 4774 bp großes Fragment, welches aus dem Exon 4 und Teilen der flankierenden Introns bestand, wurde aus genomischer ES-Zell DNA amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit den Enzymen Xma I und Xba I verdaut, woraus ein 3381 bp großes DNA-Fragment resultierte. Der pBlueskript Vektor wurde mit Xba I und Xma I geschnitten und das 3381 bp große Fragment wurde in den Vektor ligiert. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde mithilfe von Mutationsprimern das Codon 449 von TAC zu TTC geändert. Diese Mutation führt auf Proteinebene zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Phenylalanin. Eine Sequenzanalyse bestätigte die Präsenz der Mutation im Codon 449, jedoch fehlten in Teilen des Introns 3 und 4 vereinzelt Basen von repetitiven Sequenzen. Dieser Unterschied zu der verwendeten Referenzsequenz kann durch eine fehlerhafte Synthese der Polymerase in diesem Bereich oder aufgrund von SNPs in der verwendeten ES-Zell DNA erklärt werden. Da keine Fehler im Exon 4 vorlagen und das Risiko, dass die Expression des Gens durch diese Fehler im Intron beeinflusst wird, sehr unwahrscheinlich ist, wurde dieses Fragment weiter zur Klonierung verwendet. Das so veränderte Fragment wurde über einen Verdau mit Xba I und Xma I freigesetzt (Abbildung 21).

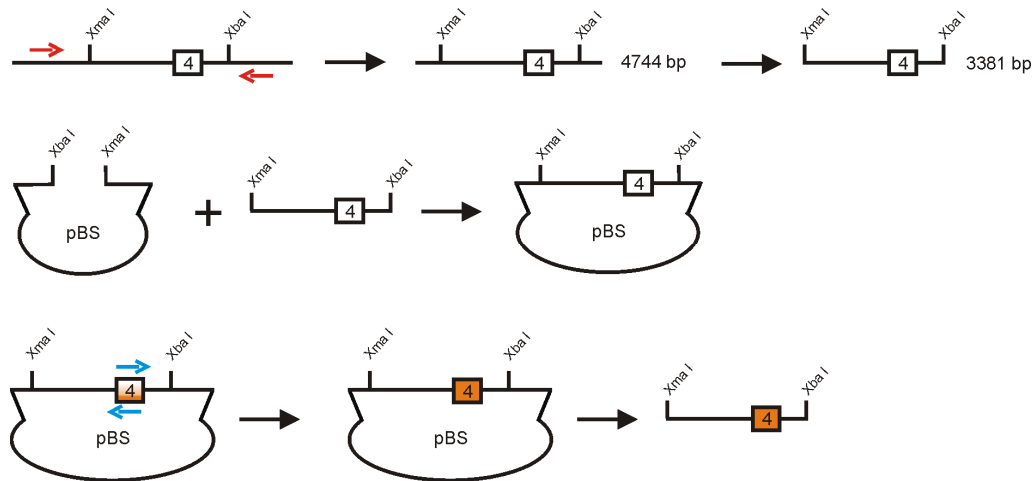


Abbildung 21: Die Gewinnung des 5'-Bereichs. Gezeigt ist die Gewinnung des ersten Teils des 5'-Bereichs mittels PCR, welcher das Exon 4 und Teile der flankierenden Introns umfasste. Die Primer für die PCR sind als rote Pfeile symbolisiert. Das PCR-Produkt wurde mit Xma I und Xba I verdaut und in den pBlueskript Vektor (pBS) subkloniert. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde mit Mutationsprimern (symbolisiert als blaue Pfeile) die Information für die Aminosäure Tyrosin an der Position 449 in Phenylalanin im Exon 4 geändert (orangefarbenes Rechteck). Über einen Verdau mit Xma I und Xba I wurde das Fragment wieder aus dem pBlueskript Vektor freigesetzt.

Das Plasmid aus Abbildung 20 wurde mit Xma I und Xba I verdaut und das zuvor präparierte 3381 bp große Fragment aus Abbildung 21 mit dem mutierten Exon 4 eingefügt (Abbildung 22).

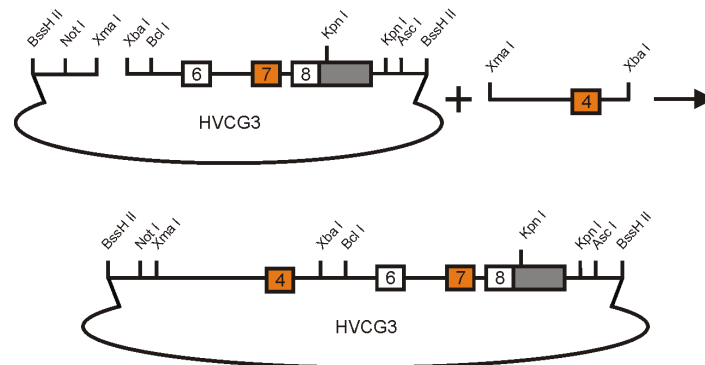


Abbildung 22: Der Aufbau des 5'-Bereichs. Der Vektor aus Abbildung 20 wurde dazu mit Xba I und Bcl I geschnitten und die schon zuvor präparierten Fragmente aus Abbildung 21 eingefügt.

Im Anschluss wurde ein 3699 bp großes Fragment, welches das Exon 5 und Teile seiner angrenzenden Introns enthielt, durch eine PCR amplifiziert. Ein Verdau dieses PCR-Produkts mit Bcl I und Xba I lieferte ein 2872 bp großes Fragment. Dieses umfasste das Exon 5 sowie die restliche Sequenz des Introns 4 und die des Introns 5. Dieses Fragment wurde in den

HVCG3 Vektor, der zuvor mit Xba I und Bcl I und verdaut wurde, subkloniert und sequenziert. Aus dem HVCG3 Vektor wurde das 2872 bp große Fragment durch einen Verdau mit Bcl I und Xba I wieder freigesetzt (Abbildung 23).

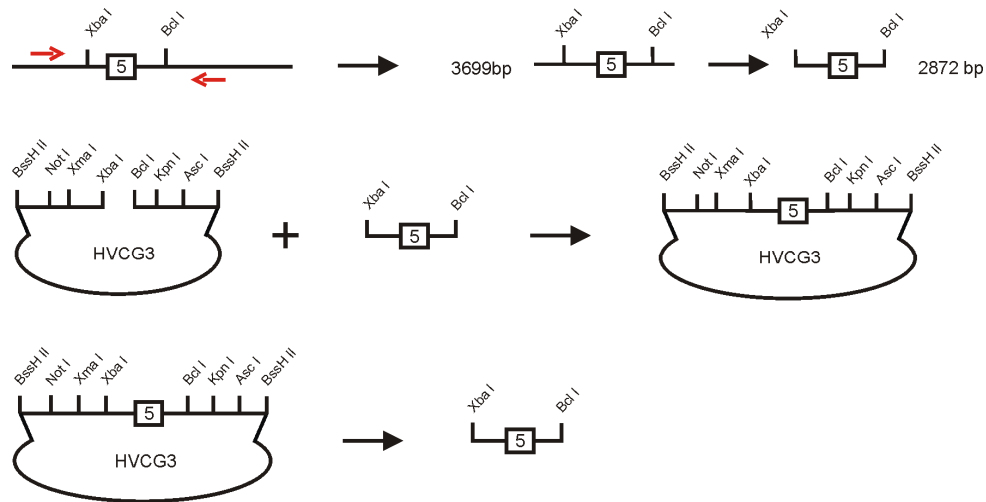


Abbildung 23: Die Gewinnung des 5'-Bereichs. Gezeigt ist die Gewinnung des zweiten Teils des 5'-Bereichs mittels PCR. Dieser Bereich umfasste das Exon 5 sowie die intronische Sequenz des Introns 4 bis zur Xba I und des Introns 5 bis zur Bcl I Schnittstelle. Die verwendeten Primer sind als rote Pfeile symbolisiert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit Xba I und Bcl I verdaut und in den HVCG3 Vektor subkloniert. Später wurde dieses Fragment über einen Verdau mit Xba I und Bcl I freigesetzt.

Im Anschluss wurde der Vektor aus Abbildung 22 mit Bcl I und Xba I geschnitten und das Exon 5 enthaltende Fragment aus Abbildung 23 eingefügt (Abbildung 24).

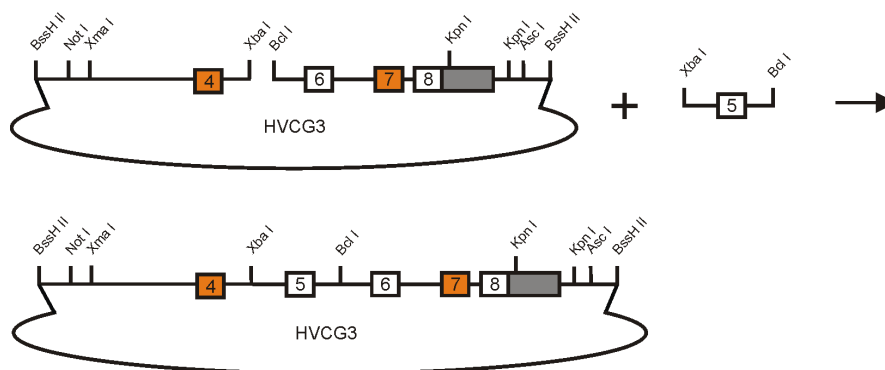


Abbildung 24: Die Fertigstellung des 5'-Bereichs. Das Plasmid aus Abbildung 22 wurde mit Bcl I und Xba I verdaut und das Fragment aus Abbildung 23 in den Vektor ligiert.

3.2.3.4 Klonierung der ACN-Kassette

Die ACN-Kassette wurde aus dem Ursprungsvektor (pACN) mit Xho I freigesetzt und in den vorher mit Xho I geschnittenen HVCg4 Vektor eingefügt. Aus diesem Vektor wurde sie über Bcl I entfernt und besaß so die für die spätere Southern Blot Strategie wichtigen Schnittstellen (Abbildung 25).

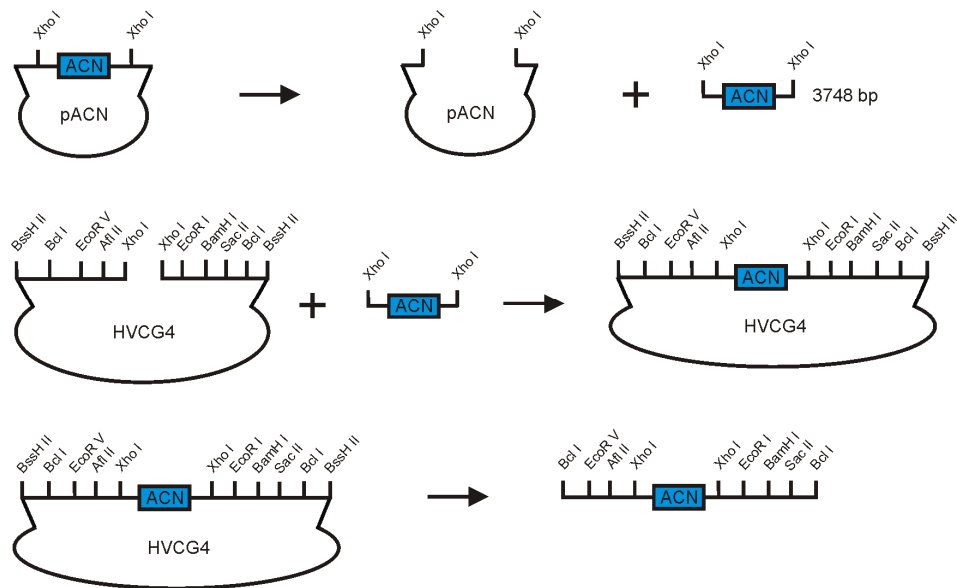


Abbildung 25: Die Vorbereitung der ACN-Kassette. Gezeigt ist die Modifikation der ACN-Kassette (blaues Rechteck) (modifiziert nach (Bunting et al. 1999)) vor dem Einfügen in das Targetingkonstrukt. Die ACN-Kassette wurde aus ihrem Ursprungsvektor durch einen Verdau mit Xho I freigesetzt. Der HVCg4 Vektor, welcher die Schnittstellen für die 5'-, 3'- und Neo- Southern Blot Strategie enthielt, wurde mit Xho I verdaut und die ACN-Kassette eingefügt. Dieses Plasmid wurde mit Bcl I geschnitten und die ACN-Kassette mit den Schnittstellen für die Southern Blot Strategie wieder freigesetzt.

Der Targetingvektor wurde im letzten Schritt mit Bcl I verdaut und die ACN-Kassette eingefügt (Abbildung 26).

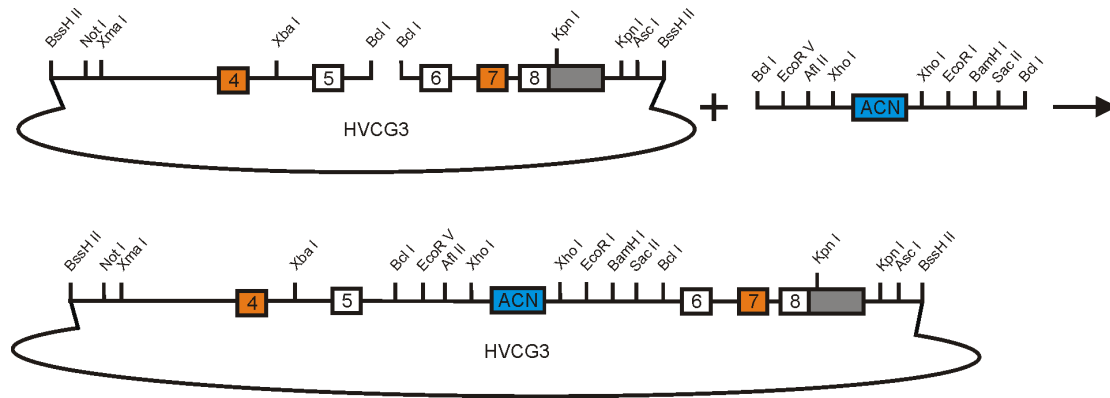


Abbildung 26: Die Fertigstellung des Targetingkonstruktes für den HCN2-Kanal. Dargestellt ist der Vektor aus Abbildung 24, welcher mit Bcl I verdaut wurde. Die vorher präparierte und modifizierte ACN-Kassette aus Abbildung 25 wurde über die Bcl I Schnittstelle in den Vektor ligiert, was den letzten Schritt zur Fertigstellung des Targetingkonstruktes darstellte.

3.2.4 Analyse des Targetingkonstruktes

Ein analytischer Verdau des fertigen Plasmids zeigte die vorher berechneten Banden, somit war der Targetingvektor fertig kloniert (Abbildung 27).

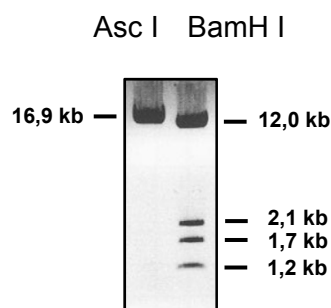


Abbildung 27: Analytischer Verdau des Targetingkonstruktes für den HCN2-Kanal. Verdaut wurden 250 ng des fertiggestellten Targetingvektors und auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen. Das Restriktionsenzym Asc I, welches den Vektor linearisiert, zeigt eine Bande bei 16928 bp, was der Größe des Targetingkonstruktes entspricht. Die Restriktionsendonuklease BamH I zeigte die vorher berechneten Banden von 1147 bp, 1657 bp, 2080 bp und 12045 bp. Aus diesem analytischen Verdau konnte geschlossen werden, dass es sich bei dem präparierten Plasmid um den fertiggestellten Targetingvektor handelte.

Eine anschließende Sequenzanalyse zeigte, dass der Vektor mit der geplanten Sequenz weitgehend übereinstimmte. Bei der Fertigstellung des Konstrukts wurde die Xma I Schnittstelle mutiert. Dieser Umstand ist für weitere Anwendungen nicht relevant, da nur 1 bp der 5'-Homologie dadurch verloren geht. Die in der ACN-Kassette festgestellten Mutationen

waren schon zuvor bekannt und sind im Promotor des Neomycin-Resistenzgens lokalisiert. In vorausgegangen Positivselektionen zeigte sich, dass diese Mutationen die Neomycin-Resistenz nicht negativ beeinflussen. Somit war dieser Vektor zur Elektroporation in ES-Zellen geeignet.

3.2.5 Vorbereitung des Targetingvektors zur Elektroporation

Der Vektor wurde mit Asc I verdaut und dadurch linearisiert. Es wurde 1 µl des Verdaus auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Da auf dem Gel nur eine definierte DNA-Bande erkennbar war, konnte der vollständige Verdau bestätigt werden (Abbildung 28). Das Konstrukt wurde anschließend aufgereinigt und in ES-Zellen elektroporiert.

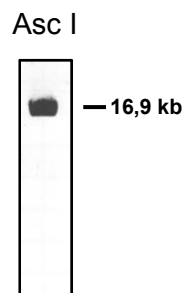


Abbildung 28: Vorbereitung des Targetingkonstruktes zur Elektroporation in ES-Zellen. Gezeigt ist ein 0,7 % Agarosegel, auf das 1 µl des präparativen Verdaus des Targetingsvektors mit Asc I aufgetragen wurde. Es sind keine Nebenbanden auf dem Gel zu erkennen. Daraus konnte geschlossen werden, dass keine Abbauprodukte des Plasmids vorhanden waren und der Verdau vollständig war. Der Vektor lag linearisiert vor und konnte in ES-Zellen elektroporiert werden.

3.2.6 Gewinnung der ES-Zellen und Extraktion der DNA

Nach der Elektroporation wurden 552 ES-Klone gepickt und daraus ES-Zell DNA für die Southern Blot Analyse gewonnen. Um die Qualität der DNA zu überprüfen und um die Konzentration abzuschätzen, wurde die DNA auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (Abbildung 29). Die Analyse des Gels zeigte, dass die Qualität und Menge der präparierten DNA für die Southern Blot Analyse geeignet war.

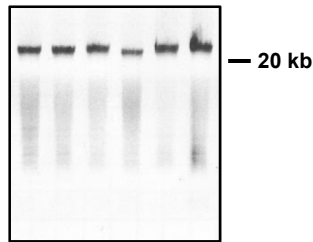


Abbildung 29: Analyse des genomischen ES-Zell DNA. Gezeigt sind je 3 μ l genomischer ES-Zell DNA verschiedener ES-Zell Klone auf einem 0,7 % Agarosegel. Die jeweilige DNA war als Bande oberhalb des DNA-Größenmarkers zu sehen. Die DNA eignete sich in Qualität und Menge für die Southern Blot Analyse.

3.2.7 Analyse der ES-Zell DNA

Um die Klone, in deren Genom das Targetingkonstrukt richtig integriert wurde zu identifizieren, wurde die ES-Zell DNA mit EcoR I verdaut und Southern Blots mit der 5'-Sonde angefertigt. So konnten 10 Klone identifiziert werden, die mindestens die ACN-Kassette und die Schnittstellen für die Southern Blot Strategien enthielten.

3.2.7.1 Sequenzanalyse der ES-Zell DNA

Um zu prüfen, ob auch die Mutationen in den HCN2-Lokus integriert waren, wurde eine Sequenzanalyse der ES-Zell DNA dieser 10 ES-Zellklone durchgeführt (Abbildung 30). Die Auswertung der Sequenzanalyse zeigte, dass unter den 10 ES-Zellklonen drei Klone alle drei Mutationen im HCN2-Gen enthielten. Drei dieser Klone trugen nur die Mutationen im Exon 7 und ein Klon enthielt nur die Mutation im Exon 4 des HCN2-Gens (Tabelle 1).

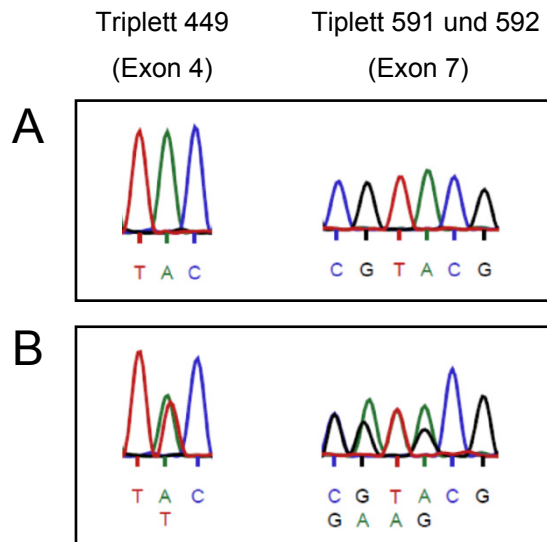


Abbildung 30: Die Sequenzanalyse der genomischen ES-Zell DNA. Gezeigt sind repräsentative Elektropherogramme der Sequenzanalyse des Exons 4 und 7 der ES-Zell DNA. **(A)** Die Sequenz des Codon 449 TAC codiert für Tyrosin. Das Triplett 591 codiert mit CGT für Arginin und mit dem Codon 592 ACG für Threonin. **(B)** Das Codon 449 des WT-Allels codiert mit dem Triplett TTC für Phenylalanin, dass Codon des KI-Allels codiert mit TAC für Tyrosin. Im WT-Allel codiert das Triplett 591 mit der Sequenz CGT für Arginin und mit dem Triplett GAA für Glutaminsäure. Im KI-Allel codiert das Codon 592 mit ACG für Threonin und mit der Sequenz GCG für Alanin.

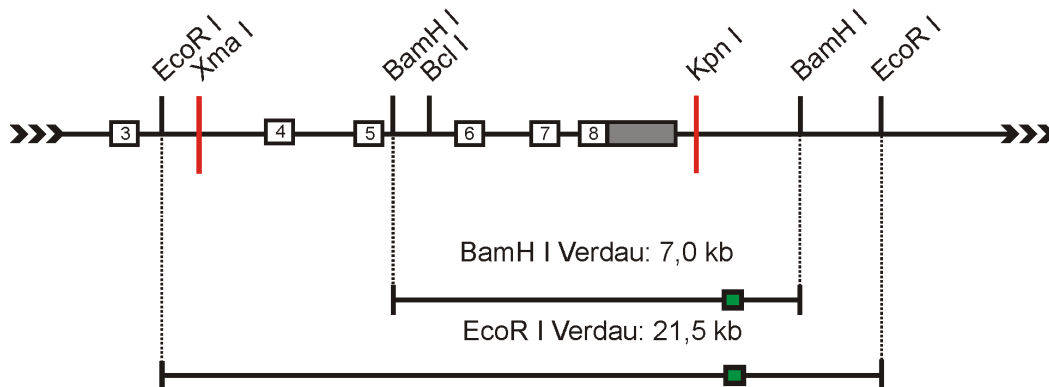
ES-Zellklon Nr.:	Codon 449	Codon 591, 592
97	Y	R / E, T / A
116	Y	R, T
141	Y / F	R / E, T / A
319	Y	R, T
323	Y / F	R, T
350	Y	R / E, T / A
361	Y	R, T
390	Y / F	R / E, T / A
429	Y	R / E, T / A
486	Y / F	R / E, T / A

Tabelle 1: Die Ergebnisse der Analyse der genomischen ES-Zell DNA durch Sequenzanalyse. Aufgeführt sind die Nummern der ES-Zellklone, welche mit Hilfe der Southern Strategie als richtige Integranden identifiziert werden konnten. Die DNA dieser ES-Zellklone sequenziert und das Ergebnis ausgewertet. Aufgeführt sind die Aminosäuren, für welche die Codons 449, 591, 592 nach der Rekombination des Targetingkonstrukts codieren. Die roten Buchstaben kennzeichnen die Aminosäuren, für welche das mutierte Codon codiert.

3.2.7.2 Southern Blot Analyse zur Prüfung der Rekombination im 3'-Bereich

Die durchgeführten Southern Blots der 3'-Strategie (Abbildung 31) zeigten die berechneten Banden für den WT und für den KI.

Wildtyp



Integrierter Vektor

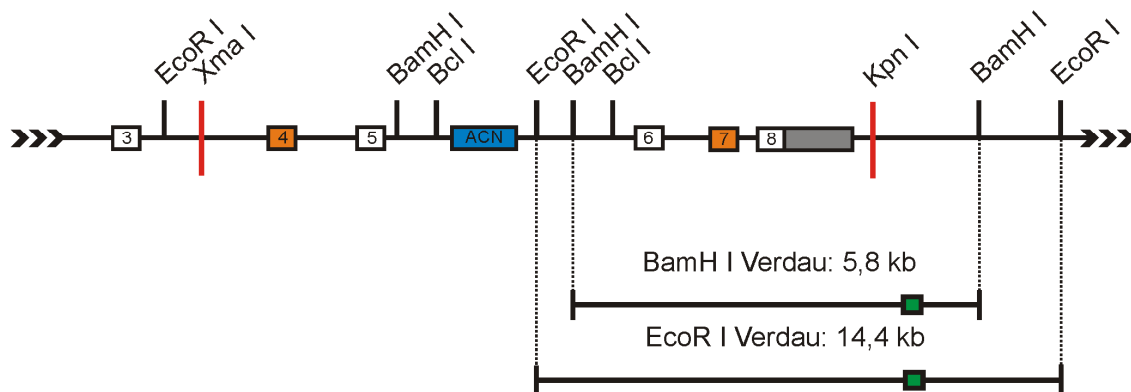


Abbildung 31: Strategie zur Überprüfung der homologen Rekombination im 3'-Bereich des HCN2-Gens.

Schematisch gezeigt sind das WT- und KI-Allel. Die 5'-und 3'-Homologiegrenzen des Targetingkonstrukts sind als rote Balken dargestellt. Durch schwarze Rechtecke sind die Exons des HCN2-Gens symbolisiert, als graues Rechteck die 3'-UTR. Weiterhin zu sehen sind die Enzym-Schnittstellen, die für die 3'-Southernstrategie relevant sind. Die durch einen Verdau mit dem entsprechenden Enzym erzeugten DNA-Fragmente, werden durch schwarze Linien mit Größenangaben dargestellt. Die außerhalb der 3'-Bereichs des Targetingkonstrukts lokalisierte 3'-Sonde ist als grünes Rechteck dargestellt.

Dieses Ergebnis bestätigte, die korrekte Integration des Targetingkonstrukts in den 3'-Bereich des HCN2-Lokus (Abbildung 32).

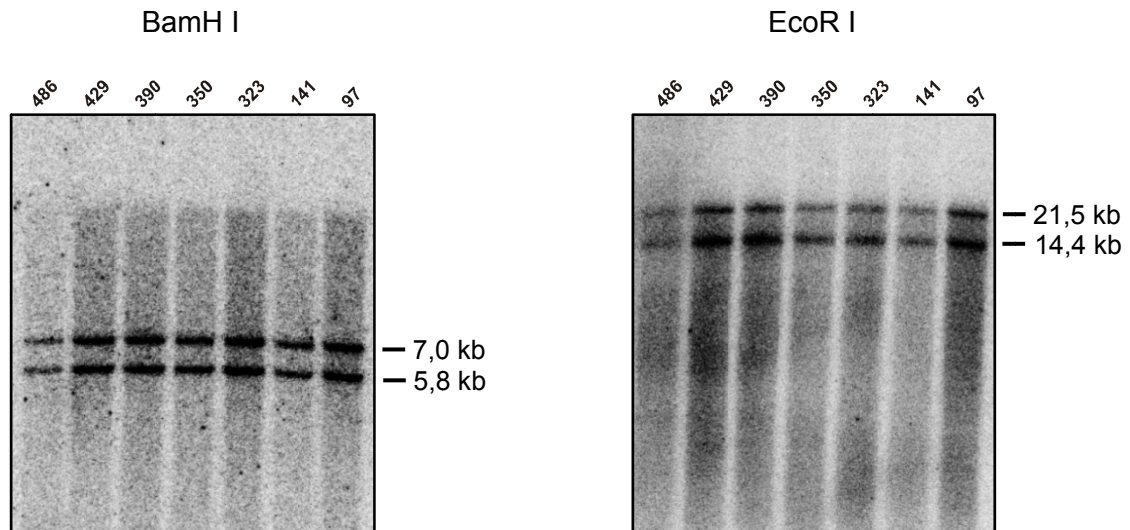
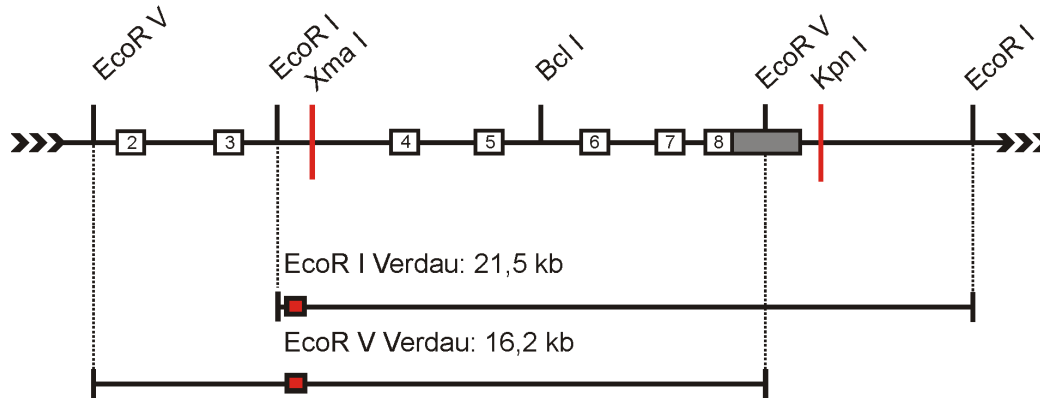


Abbildung 32: Southern Blot zur Überprüfung der ES-Zellklone auf korrekte homologe Rekombination im 3'-Bereich des HCN2-Gens. Gezeigt sind die autoradiographisch ausgewerteten Membranen des durchgeführten 3'-Southern Blots. Es konnten die vorher berechneten Banden für das WT-Allel (BamH I mit 7,0 kb und EcoR I mit 21,5 kb) detektiert werden. Ebenso konnten die Banden des KI-Allels (für BamH I 5,8 kb und für EcoR I 14,4 kb) detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigte, dass die homologe Rekombination des Targetingkonstrukts erfolgreich verlaufen war.

3.2.7.3 Southern Blot Analyse zur Prüfung der Rekombination im 5'-Bereich

Mit weiteren Southern Blot Experimenten wurde der 5'-Bereich überprüft (Abbildung 33).

Wildtyp



Integrierter Vektor

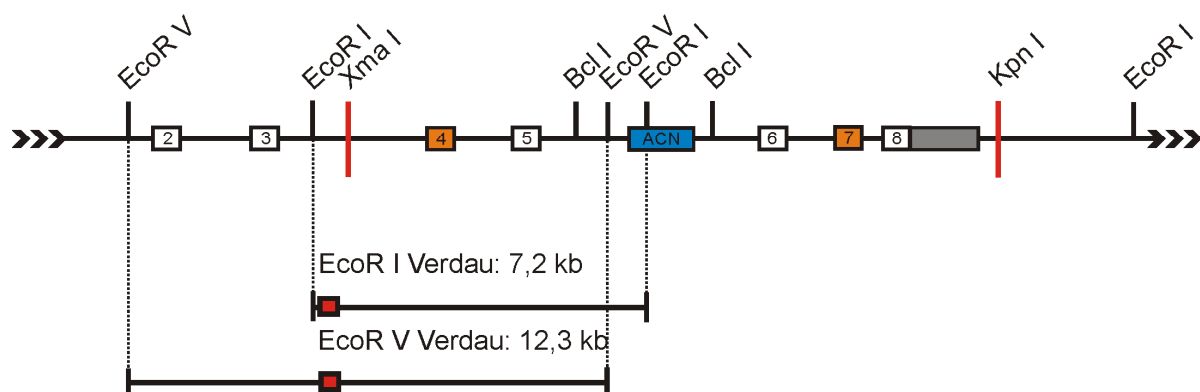


Abbildung 33: Strategie zur Überprüfung der homologen Rekombination im 5'-Bereich des HCN2-Gens.

Gezeigt ist die schematische Darstellung des 5'-Bereichs des WT- und KI-Allels. Die Grenzen der Homologie des Targetingkonstrukts sind als rote Balken dargestellt. Die Exons des HCN2-Gens sind durch schwarze Rechtecke symbolisiert, die 3'-UTR als graues Rechteck. Desweiteren werden die für die 5'-Southernstrategie benötigten Enzym-Schnittstellen aufgeführt. Die DNA-Fragmente, die durch einen Verdau erzeugt werden, sind durch schwarze Linien mit Größenangaben dargestellt. Das rote Rechteck symbolisiert die 5'-Sonde, die außerhalb des Bereichs des Targetingkonstrukts liegt.

Der 5'-Southern Blot zeigte die jeweils erwarteten Banden (Abbildung 34). Somit konnte die korrekte Integration des Targetingkonstrukts in den HCN2-Lokus bestätigt werden.

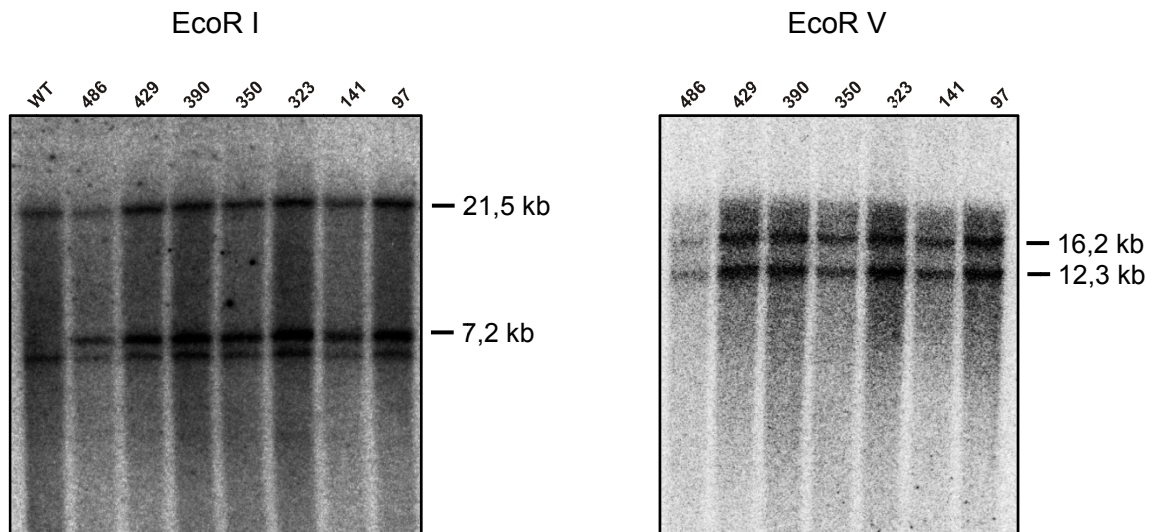


Abbildung 34: Southern Blot zur Überprüfung der ES-Zell Klone auf korrekte homologe Rekombination im 5'-Bereich. Gezeigt werden die autoradiographisch ausgewerteten Membranen des 5'-Southern Blot. Die Auswertung zeigte die vorher berechneten Banden für das WT-Allel (EcoR I mit 21,5 kb und EcoR V mit 16,2 kb). Ebenso konnten die errechneten Banden für das KI-Allel detektiert werden (EcoR I 7,2 kb und für EcoR V 12,3 kb). Dieses Ergebnis zeigt die richtige Rekombination des Konstrukts in den 5'-Bereich des Allels an. In dem Southern Blot mit EcoR I ist eine unspezifische Bande unterhalb des Bereichs der KI-Bande zu sehen. Sie konnte auch im Verdau der DNA aller anderen WT ES-Zellklone detektiert werden (siehe WT-Kontrolle). Diese Bande ist wahrscheinlich auf eine unspezifische Bindung der Sonde an ein anderes Fragment der DNA zurückzuführen und ist für die Auswertung des Experiments nicht relevant.

3.2.7.4 Southern Blot Analyse zur Prüfung auf Mehrfachintegration

Um eine Mehrfachintegration auszuschließen wurde ein Southern Blot durchgeführt, bei dem eine Sonde verwendet wurde, die sich gegen das Neomycin-Resistenzgen richtete (Abbildung 35). Dieser Blot zeigte die erwarteten Banden, da für jeden Klon nur eine Bande detektiert werden konnte.

Integrierter Vektor

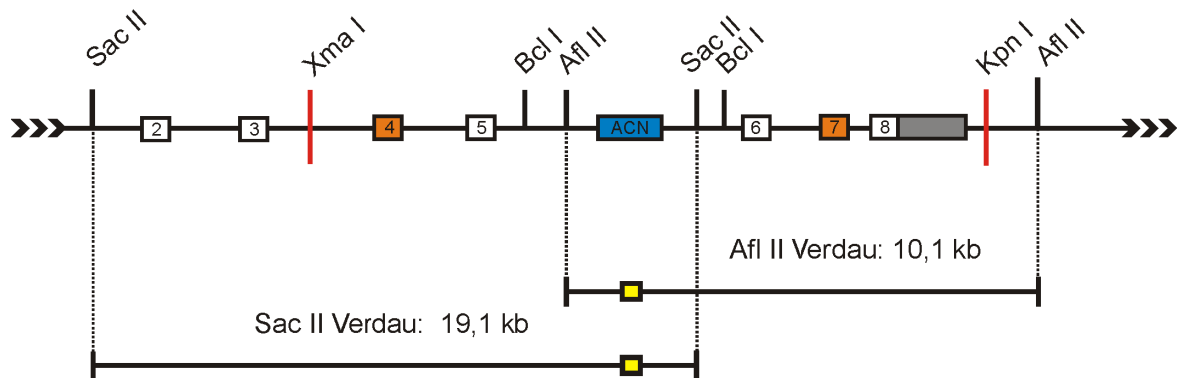


Abbildung 35: Strategie zur Prüfung der ES-Zellklone auf Mehrfachintegration des Targetingkonstrukts.

Schematisch dargestellt ist das KI-Allel und die Strategie zur Prüfung auf eine Mehrfachintegration des Targetingkonstrukts. Als rote Balken sind die 5'- und 3'-Homologiegrenzen des Targetingkonstrukts dargestellt. Durch schwarze Rechtecke werden die Exons des HCN2-Gens symbolisiert, als graues Rechteck die 3'-UTR. Des Weiteren sind die relevanten Enzym-Schnittstellen der Southern Blot Strategie dargestellt. Die durch einen Verdau mit den Enzymen Afl II und Sac II erzeugten DNA-Fragmente werden mit ihren Größenangaben durch schwarze Linien dargestellt. Die innerhalb des Targetingkonstrukts in der ACN-Kassette lokalisierte Sonde wird durch ein gelbes Rechteck symbolisiert.

Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass das Targetingkonstrukt nur einmal in das Genom der ES-Zelle integriert hatte (Abbildung 36).

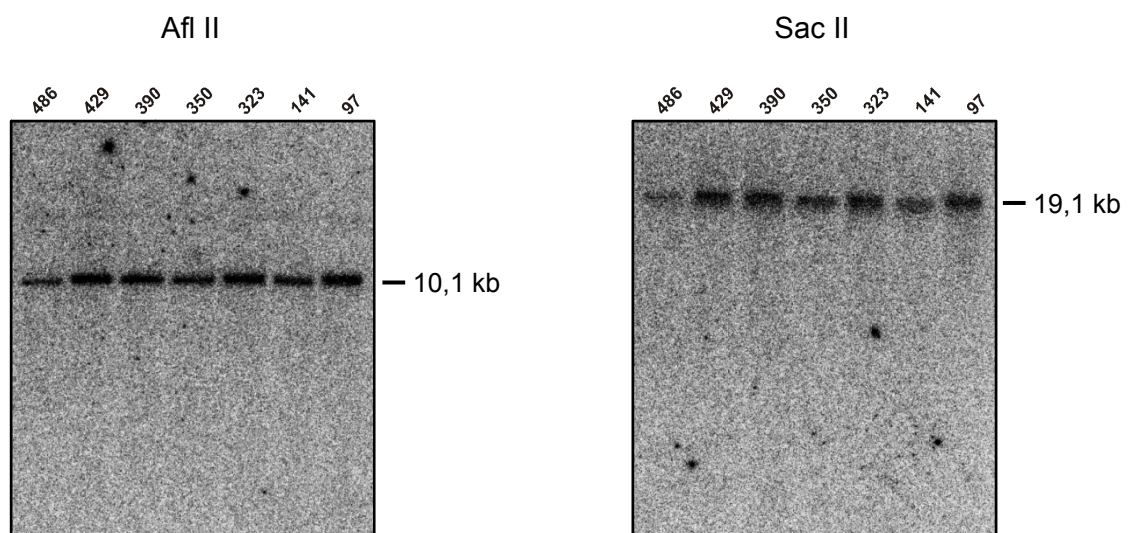


Abbildung 36: Southern Blot zur Prüfung der ES-Zellklone auf eine Mehrfachintegration des Targetingkonstrukts.

Mithilfe einer Sonde, die sich gegen das Neomycin-Resistenzgen richtete, konnte jeweils eine Bande definierter Größe (für Afl II mit 10,1 kb und für Sac II mit 19,1 kb) detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Targetingkonstrukt nur einmal in das Genom der ES-Zellklone integriert hatte.

3.2.7.5 Sequenzanalyse der 5'- und der 3'-Übergänge nach der Rekombination

Im Anschluss an die Southern Blot Experimente wurden die 5'- und 3'-Übergänge sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, dass bei der Integration in diesem Bereich keine Fehler aufgetreten waren. Für den 3'-Bereich war dies besonders wichtig, da sich auf dem Gegenstrang des HCN2-Gens die DNA gerichtete mitochondriale RNA-Polymerase „POLRMT“ befindet (www.ensembl.org Transcript ID: ENSMUSG00000020329).

3.2.8 Blastozysteninjektion von ES-Zellen

Die Injektion der ES-Zellklone mit dem korrekt integrierten Targetingkonstrukt in Blastozysten wurde in Kooperation am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Dieser Schritt diente der Generierung von chimären Mäusen (Talts et al. 1999). Aus diesem Prozess gingen nur aus dem Klon 486 (HCN2-FEA) Mäuse hervor. Davon waren sechs Mäuse männlich und eine Maus weiblich. Unter den sechs Männchen hatten fünf Tiere zu ca. 90% agoutifarbenes Fell (Abbildung 37) und sind somit zur Verpaarung und Zucht von heterozygoten HCN2-FEA Knockin Mäusen geeignet.

Die gemischte Fellfarbe chimärer Mäuse beruht auf der unterschiedlichen Herkunft der Blastozysten und der darin implantierten ES-Zellen aus verschiedenen Mausstämmen. Die Blastozysten stammten aus Mäusen mit schwarzer Fellfarbe (C57Bl / 6J), die implantierten ES-Zellen hingegen aus Mäusen mit brauner Fellfarbe (129 / Sv). Somit gibt der Anteil an brauner Fellfarbe der chimären Maus Auskunft darüber, wie hoch der Beitrag implantierter ES-Zellen an der Gesamtentwicklung des Organismus ist. Je größer der Anteil an brauner Fellfarbe, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich auch die Keimbahnzellen aus den implantierten ES-Zellen entwickelt haben (sogenannte Keimbahngängigkeit). Erfahrungsgemäß zeigen Tiere mit einem Chimärismus von mehr als 70% eine ausreichend hohe Keimbahngängigkeit.

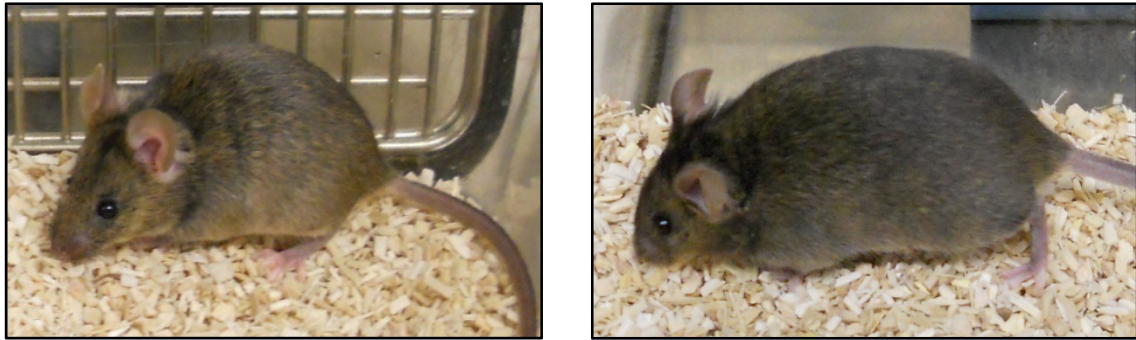


Abbildung 37: Die chimären HCN2-FEA Mäuse. Gezeigt sind chimäre HCN2-FEA Mäuse die aus dem Gentergeting hervorgegangen sind. Die Fellfarbe der Tiere ist zu ca. 90 % agouti, was einem Chimärismus von 90 % entspricht. Die chimären Mäuse sind somit zu Verpaarung und Generierung einer Knockin Mauslinie geeignet.

3.2.9 Genotypisierungsstrategie

Um die Nachkommen dieser Mauslinie genotypisieren zu können, wurde eine Genotypisierungsstrategie mittels PCR getestet. Grundlage dieser Strategie ist, dass nach der Entfernung der ACN-Kassette durch die Cre-Rekombinase eine loxP-Sequenz sowie die Schnittstellen der Southern Blot Strategie im Genom der Tiere verbleiben (Abbildung 38).

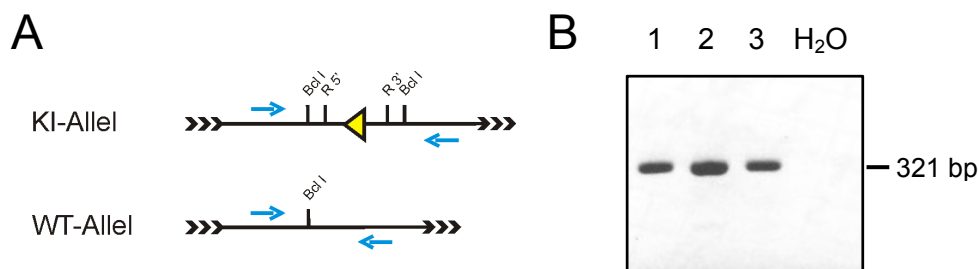


Abbildung 38: Die Genotypisierungsstrategie. (A) Schematisch gezeigt ist der Bereich der Bcl I Schnittstelle im Intron 5 des HCN2-Gens. Im KI-Allel verbleibt nach der Exzision der ACN-Kassette durch die Cre-Rekombinase eine loxP-Sequenz (gelbes Dreieck), sowie die Schnittstellen der Southern Blot Strategie (R 5' und R 3'). Die Primer für die Genotypisierungsstrategie sind als blaue Pfeile symbolisiert. Aufgrund der zusätzlichen Sequenz im KI-Allel entsteht im Vergleich zum WT-Allel ein längeres PCR-Produkt (KI: 436 bp, WT: 321 bp). So können WT von heterozygoten und homozygoten Nachkommen unterschieden werden. (B) Eine PCR aus genomischer DNA von WT-Mäusen lieferte das richtige Produkt. Es wurden 12,5 µl der PCR auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen.

Die PCR-Primer befinden sich im Bereich um die Bcl I Schnittstelle im Intron 5. Ausgehend vom WT-Allel entsteht ein 321 bp großes PCR-Produkt, dass sich von dem 436 bp langem Fragment des mutierten Allels deutlich unterscheidet. Die Differenz von 115 bp entsteht durch die Präsenz einer loxP-Sequenz sowie der Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme beim KI-Allel. Eine PCR von heterozygoten Tieren liefert entsprechend sowohl die WT- als auch die KI-Bande. Aus der DNA homozygoter Tiere lässt sich nur das KI-Fragment amplifizieren.

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, eine Knockin Mauslinie zu generieren, deren HCN2-Kanäle durch eine HCN2-Kanalmutante ersetzt sind. Die mutierten Kanäle können nicht mehr durch cAMP koaktiviert werden, ihre Aktivierungskurve ist aber soweit in den positiven Spannungsbereich verschoben, dass die Kanäle im physiologischen Membranspannungsbereich funktionell sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden chimäre HCN2-FEA Knockin Mäuse generiert. Durch Verpaarung der chimären Knockin Mäuse mit WT-Mäusen können Tiere hervorgehen, die für die HCN2-FEA-Mutation heterozygot sind. Da sich die ACN-Kassette selbst aus dem Genom der Tiere entfernt (*self-excision cassette*) ist eine spätere Kreuzung mit *Cre-deleter* Mäusen nicht notwendig. Durch Verpaarung der heterozygoten Mäuse sollen homozygote Tiere gezüchtet werden, die ausschließlich das veränderte Kanalprotein exprimieren. Es wird erwartet, dass die erzeugten homozygoten Knockin Mäuse wie auch HCN2-Knockout Tiere, lebensfähig sein werden. (Ludwig et al. 2003). Sobald homozygote Tiere vorliegen, muss der Genotyp der Tiere sowie die vollständige Deletion der ACN-Kassette aus dem Genom mit einer Southern Blot Analyse überprüft werden. Um auszuschließen, dass die Veränderungen des HCN2-Gens zu Spleißfehlern und dadurch zu einer veränderten mRNA oder zu einem Abbau der mRNA führen, muss ein Nachweis mutierter intakter mRNA erfolgen. Im Anschluss muss auf Proteinebene überprüft werden, ob die Mutationen die Expressionsrate des HCN2-FEA-Kanalproteins beeinflussen oder eventuell zu dessen Abbau führen. Schließlich muss mithilfe immunhistochemischer Methoden gezeigt werden, dass die Mutationen nicht eine veränderte Lokalisation des HCN2-FEA-Kanals bewirkt. Sollte sich bestätigen, dass dieses mutierte HCN2-Kanalprotein in seiner Expression und Lokalisation nicht beeinträchtigt wird, können weitere Experimente zur Aufklärung der physiologischen Rolle der cAMP-Koaktivierung des HCN2-Kanalproteins durchgeführt werden.

Analyse des kardialen Phänotyps der Maus:

Aus vorrangigen Untersuchungen ist bekannt, dass die Deletion des HCN2-Kanals zu einer Sinusarrhythmie führt (Ludwig et al. 2003). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die erzeugten Knockin-Mäuse einen veränderten kardialen Phänotyp zeigen können. Um die Rolle der cAMP abhängigen Koaktivierung des HCN2-Kanals für die Kontrolle des Herzschlags zu untersuchen, sollen telemetrische EKG Ableitungen an diesen Tieren durchgeführt werden. Daraus können wichtige Informationen über die kardiale

Schrittmacherfunktion wie die Ruheherzfrequenz, die Rhythmizität und der Frequenzanstieg bei körperlicher Aktivität erhalten werden. Durch Mikroelektrodenableitungen an Sinusknotenpräparaten kann Aufschluss über die Bedeutung der cAMP abhängigen Regulation der HCN2-Kanäle bei der Entstehung des Schrittmacherpotentials (langsame diastolische Depolarisation), der Aktionspotentialmorphologie und -frequenz und der räumlichen Erregungsausbreitung erhalten werden. In weiterführenden „*Patch-Clamp*“ Experimenten an isolierten Schrittmacherzellen aus dem Sinusknoten kann der Frage nachgegangen werden, inwieweit die cAMP-Koaktivierung des HCN2-Kanals funktionell für das zelluläre Aktionspotential und die langsame diastolische Depolarisation relevant ist. Um die Rolle der cAMP-Koaktivierung der HCN2-Kanäle für die ventrikuläre Funktion zu analysieren, sollen die EKG-Aufzeichnungen von WT und von homozygoten Knockin Tieren hinsichtlich atrialer und ventrikulärer Funktion verglichen werden. Analog zu den oben beschriebenen Experimenten können *Patch-Clamp* Experimente an isolierten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten durchgeführt werden.

Analyse des neuronalen Phänotyps der Maus:

Der HCN2-Kanal wird im Gehirn nahezu ubiquitär exprimiert (Notomi and Shigemoto 2004). Eine besonders hohe Expression des Proteins lässt sich im Thalamus und im Hirnstamm nachweisen (Moosmang et al. 1999; Notomi and Shigemoto 2004; Santoro et al. 2000). Passend zu der breiten Verteilung von HCN2 im zentralen Nervensystem zeigen HCN2-Knockout Mäuse verschiedene neurologische Defizite wie Ataxie und das Auftreten von Absence-Epilepsien (Ludwig et al. 2003), sowie ein verändertes Lern- und Angstverhalten (Matt et al. 2011) und eine veränderte Schmerzwahrnehmung (Emery et al. 2011). Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann die Rolle der cAMP-Koaktivierung des HCN2-Kanalproteins im Gehirn durch eine Reihe neurologischer Untersuchungen und Verhaltenstests sowie motorischer Koordinationstests an den Tieren untersucht werden. Zusätzlich sollen telemetrische Elektroenzephalogramme abgeleitet werden um eventuelle Änderungen der neuronalen Aktivität dieser Tiere festzustellen. Zum Beispiel könnte sich die statische cAMP-Koaktivierung des HCN2-Kanals auf die Oszillationen der Neuronen im thalamokortikalen Netzwerk auswirken. Der I_h nimmt eine wichtige Rolle bei der Entstehung rhythmischer Oszillation im *Burst*-Modus während des Non-REM-Schlafs (Tiefschlaf) ein. Die Tiere könnten Veränderungen der Tiefschlafphase sowie Störungen beim Übergang vom Schlaf- in den Wachzustand aufweisen. Somit ist es notwendig die einzelnen Schlafphasen

der Tiere auf pathologische Veränderungen hin zu untersuchen. Des Weiteren sind *Patch-Clamp* Experimente an thalamischen Neuronen geplant. Damit können die Auswirkungen der statischen cAMP-Koaktivierung des HCN2-Kanals auf die beiden Aktivitätsmodi *Burst*- und *Transmission*-Modus dieser Neurone untersucht werden. Sollten sich bei diesen Tieren Anhaltspunkte für neuronale Defekte zeigen, werden sich vertiefende Untersuchungen anschließen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der I_h ist ein Ionenstrom, der bei Hyperpolarisation aktiviert und durch Na^+ und K^+ getragen wird. Dieser Strom ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. So ist er an der Entstehung des autonomen Herzschlags und an der Entstehung rhythmischer Netzwerkoszillationen in den Neuronen des thalamokortikalen Netzwerks beteiligt, welche für den Schlaf-Wachrhythmus von großer Bedeutung sind (Biel et al. 2009). Die Ionenkanäle, die dem I_h zugrunde liegen, werden als HCN-Kanäle bezeichnet. Sie bilden eine kleine Proteinfamilie mit vier Mitgliedern (HCN1-HCN4) (Ludwig et al. 1998; Santoro et al. 1998). HCN-Kanäle öffnen bei einer Hyperpolarisation der Zellmembran und werden durch Zyklonukleotide koaktiviert (DiFrancesco 1993). Sie besitzen neben einem Spannungssensor, der für die spannungsabhängige Öffnung verantwortlich ist, eine Zyklonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD). Es liegt nahe, dass die CNBD von HCN-Kanälen für die cAMP-abhängige Modulation des Herzschlags oder der Netzwerkoszillationen im Gehirn wichtig ist. Diese Hypothese konnte bisher allerdings nicht experimentell verifiziert werden. Ziel dieser Arbeit war es diese Fragestellung für den HCN2-Kanal zu klären.

Hierfür sollte eine Knockin Mauslinie erzeugt werden, deren HCN2-Kanäle durch zwei Mutationen in der CNBD nicht mehr durch Zyklonukleotide koaktiviert werden können. In elektrophysiologischen Vorexperimenten an heterolog exprimierten Kanälen zeigte sich, dass die isolierte Inaktivierung der CNBD zu einer ausgeprägten Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung führt. Dies hat zur Folge, dass der Kanal unter physiologischen Bedingungen überhaupt nicht mehr aktivierbar ist.

Um diese Problematik zu umgehen wurde in umfangreichen Screens versucht den HCN2-Kanal durch weitere Mutationen so zu verändern, dass seine Aktivierungsspannung hin zu depolarisierenden Potentialen verschoben wird und damit der hyperpolarisierende Effekt der Inaktivierung der CNBD ausgeglichen werden kann. Der gewünschte Effekt konnte durch eine Mutation im C-Linker erreicht werden. Darauf basierend wurden durch homologe Rekombination ES-Zellklone hergestellt, deren HCN2-Kanal die vorher beschriebene Mutation im C-Linker sowie zwei Mutationen in der CNBD enthält, die die Bindung von cAMP verhindern.

Das Screening der ES Zellen erforderte die Analyse von 552 Klonen mittels Southern Blot Analyse und anschließender Sequenzanalysen. Die identifizierten ES-Zellen wurden in Blastozysten injiziert. Aus den erhaltenen Mäusen können durch Verpaarungen Tiere entstehen, die homozygot für alle drei Mutationen des HCN2-Kanals sind (HCN2-FEA). Im Anschluss sollen Untersuchungen zur Funktion des Herzens und des Gehirns bei diesen HCN2-FEA Mäusen durchgeführt werden. An diesen Tieren kann erstmals untersucht werden, welche physiologische Rolle die cAMP-abhängige Koaktivierung des HCN2 Kanals hat.

6. ANHANG

6.1 Verwendete Primer

Primer zur Generierung der 5'-Sonde

HCN2_Intron2_1f	5'-CCTGAATCTGTCCCATTCCTG-3'
HCN2_5Sonde_3r	5'-TCAGATACCAAGGCACGTGG-3'

Primer zur Generierung der 3'-Sonde

HCN2_3Sonde_3f	5'-ACTCTCATCTACCGAGCTGG-3'
HCN2_3Sonde_3r	5'-GTCACGTAATGGCTTCCCTG-3'

Primer zur Generierung der Neo-Sonde

ACN_Neo_for	5'-AGGCGATAGAAGGCGATGCG-3'
ACN_Neo_rev	5'-TGGGATCGGCCATTGAACAAGATG-3'

Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des Exon 4 im Bereich des Codon 449

HCN2ScreenEx4Rev	5'-GAACACTCAGAACTGGTCCC-3'
HCN2ScreenEx4For	5'-TTGCAATTGCAGAACCACTCG-3'

Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des Exon 7 im Bereich der Codons 591, 592

HCN2_Geno_5f	5'-GGAAGAAGATGTACTTCATCCAG-3'
HCN2_Geno_2r	5'-TGCCCCACTGGAATGGAGCC-3'

Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des 3'-Übergangs des Targetingkonstrukts

UG-TVHCN2-3'-for	5'-ATGGATCAAGTGCAATACTCGG-3'
UG-TVHCN2-3'-rev	5'-CCTACAATTTCTGTCCACAGG-3'
Intr17mitRNAPol	5'-TTGATGCTGCAAACAGGTTAGG-3'

Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des 5'-Übergangs des Targetingkonstrukts

UG-TVHCN2-5'-for	5'-CCTGCTATGATAGTTGATGGG-3'
UG-TVHCN2-5'-rev	5'-CCCAGTGCTGGGATTAAAGG-3'

Mutationsprimer für die zielgerichtete Mutagenese im Exon 4

HCN2Ex4Y449Ffor	5'-CACGGCGCCAATTCCAGGAGAAG-3'
HCN2Ex4Y449Frev	5'-CTTCTCCTGGAATTGGCGCCGTG-3'

Primer zur Klonierung der 5'-Homologie

Primer zur Generierung des ersten Fragments der 5'-Homologie (ein Teilstück des Introns 3, das Exon 4 sowie den ersten Teil des Introns 4)

HCN2_Intron2_1f	5'-CCTGAATCTGTCCCATTCCTG-3'
HCN2_Intron4_2r	5'-GCTCTACCTCTACTGGGATG-3'

Primer zur Generierung des zweiten Fragments der 5'-Homologie (der zweite Teil des Introns 4, das Exon 5 sowie ein Teilstück des Introns 5)

HCN2_Intron4_3f	5'-ACATGCACAGTGAGCTTGGC-3'
HCN2_Intron5_4r	5'-ATGAGTGACACTGAACTGGAG-3'

Modifizierte Oligodidesoxynukleotide zur Generierung einer neuen MCS

Für den HVCG3-Vektor

HVCG3for	5'Pho-CGCGCATTTGCGGCCGCAATCCC GGGTGCTCTAGAGCATGATCAGGGGTA CCGGCGCGCCG-3'
HVCG3rev	5'Pho-CGCGCGGCGCGCCGGTACCCCTG ATCATGCTCTAGAGCACCCGGGATTGC GGCCGCAAATG-3'

Für den HVCG4-Vektor

HVCG4for	5'Pho-CGCGCTGATCAGATATCCTTAAG CTCGAGGAATTCGGATCCCCGCGGTGA TCAG-3'
HVCG4rev	5'Pho-CGCGCTGATCACCGCGGGGATCC GAATTCCTCGAGCTTAAGGATATCTGAT CAG-3'

Primer für die Genotypisierung

HCN2Genolxpfor	5'-AGTTGTACTCAACCAGTGGC-3'
HCN2Genolxprev	5'-TAGTCACGGTCACTGCCAAG-3'

Primer für die Sequenzanalysen

pBlueMCSCGfor	5'-TTCGCTATTACGCCAGCTGG-3'
OP_HV_Seq_f	5'-CGCCATTTCAGGCTGCGCAAC-3'
HCN2Ex4Seq0f	5'-CCAGGCATGGTAGCATATAC-3'
HCN2_Ex4_Seq_1f	5'-CCCTGGAATCAGAGTTAGAG-3'
HCN2_Ex4_Seq1fb	5'-GAACTCATGACCATCTTGCC-3'
HCN2_Ex4_Seq_2f	5'-GACAGACCATTAAGAGCCTG-3'
HCN2_Ex4_Seq_3f	5'-CTCTGACTGGGTCAAGTGAG-3'
HCN2_Ex4_Seq3fb	5'-AGACATCTGGCTGACCATGC-3'
HCN2_Ex4_Seq_4f	5'-GGCTTCTGTAAGAGCTGAGG-3'
HCN2_Ex4_Seq4fb	5'-AGGAACCTTGGCTTCAGCAG-3'
HCN2Ex4Seq4bf	5'-ACATGCACAGTGAGCTTGGC-3'
HCN2_Ex4_Seq_5f	5'-AACATGCACAGTGAGCTTGG-3'
HCN2Ex4Seq4cf	5'-AAAGTGTATCACCCTGTATC-3'
HCN2_Ex5_Seq_1f	5'-CTGGGATGAACTCTGTCAC-3'
HCN2_Ex5_Seq_2f	5'-CTGAAACACACATCTGTGCG-3'
HCN2_Ex5_Seq_3f	5'-AGCTGGAGTTCCATACACTG-3'
HCN2_Ex5_Seq3fb	5'-AGTCCCATTACAGCTTCTG-3'
HCN2_Ex5_Seq_4f	5'-TGAATTACAGGAGGAGGCTG-3'
HCN2_Seq_Ex5_5f	5'-TGTATGCTATACGAAGTTATGG-3'
pACN_2f	5'-TCGCTTGGTGGTTCGAATGG-3'
pACN_3fn	5'-CGCTTCTGAGGAGAGAAGT-3'
pACN_3fn2	5'-TGTCCTACGCATCGGTAATG-3'
pACN_4f	5'-TTGCCGCTCAGCTTTACAG-3'
pACN_5f	5'-TACCCCCAGGCTAAGTGC-3'
pACN_6f	5'-ATCGACCGGTAATGCAGG-3'
pACN_7f	5'-CTGCAACACCTGCCTGC-3'
HCN2_In5Seq_6f	5'-GTGACCTTGAACCTCCTGATC-3'
HCN2_In5_Seq6f2	5'-CACAGGAGATTGTGAACTTCA-3'
HCN2_Ex6Seq_7f	5'-GATGTACTTCATCCAGCATG-3'
HCN2_In5_Seq7f2	5'-ATGGCATGGCATATGCTCAG-3'
HCN2_In7Seq_8f	5'-CAGAATCACAGGGCCTGGTG-3'
HCN2_In7_Seq8f2	5'-GGCATTTTCAGATGCACTTGC-3'
HCN2_Ex8Seq_9f	5'-CATCATCCAGGAGATTGTCA-3'
HCN2_Ex8_Seq9r	5'-ATGGCTTTGGTGTGGATGAC-3'
HCN2_Ex8Seq_10f	5'-TCGACCCACTGGACTCTGCG-3'
HCN2_Ex8_Seq10r	5'-CCCACCAAAGTAATGAGACG-3'
HCN2_Ex8Seq_11f	5'-CGTCGCCATGAATGTACTGA-3'
pBS_HV_Seq_r	5'-GTGAGTTAGCTCACTCATTAGG-3'
HCN2_3'UTRSeq12f	5'-TGCAGGCGCACGAATTGCTC-3'

6.2 Sequenz des Targetingvektors

1	CTAAATTGTA	AGCGTTAATA	TTTTGTAAAA	ATTCGCGTTA	AATTTTTTGT	AAATCAGCTC
61	ATTTTTTAAAC	CAATAGGCCG	AAATCGGCAA	AATCCCTTAT	AAATCAAAAG	AATAGACCGA
121	GATAGGGTTG	AGTGTGTGTC	CAGTTTGGAA	CAAGAGTCCA	CTATTAAAGA	ACGTGGACTC
181	CAACGTCAAA	GGGCGAAAAA	CCGTCTATCA	GGGCGATGGC	CCACTACGTG	AACCATCACC
241	CTAATCAAGT	TTTTTGGGGT	CGAGGTGCCG	TAAAGCACTA	AATCGGAACC	CTAAAGGGAG
301	CCCCCGATTT	AGAGCTTGAC	GGGGAAGGCC	GGCGAACGTG	GCGAGAAAGG	AAGGGAAGAA
361	AGCGAAAGGA	GCGGGCGCTA	GGGCGCTGGC	AAGTGTAGCG	GTCACGCTGC	GCGTAACCAC
421	CACACCCGCC	GCGCTTAATG	CGCCGCTACA	GGGCGCGTCC	CATTCGCCAT	TCAGGCTGCG
481	CAACTGTTGG	GAAGGGCGAT	CGGTGCGGGC	CTCTTCGCTA	TTACGCCAGC	TGGCGAAAGG
541	GGGATGTGCT	GCAAGGCGAT	TAAGTTGGGT	AACGCCAGGG	TTTTCCAGT	CACGACGTTG
pBlueskript Vektor ← Targetingkonstrukt HCN2-FEA						
601	TAAAACGACG	GCCAGTGAGC	GCGCGATTTG	CGGCCGCAAT	CCGGGGCCTC	CTGAGACAGC
661	TCAGCAGCCA	TTTTTCCATG	TCACACAGAT	ATACTGCTCA	GCATCTTCTT	TTTTTTTTTT
721	TAAAGATTTA	TTTATTTATT	ATATGTAAGT	ACACTGTAGC	TGTCTTCAGA	CACTCCAGAA
781	GAGGGCATCA	GATCTCGTTA	CGGATGGTTG	TGAGCCACCA	TGTGGTTGCT	GGGATTTGAA
841	CCTCAGACCT	TCGGAAGAGC	AGTCGGTGCT	CTTACCCACT	GAGCCATCTC	ACCAGCCCA
901	CATCTTCTTA	CTATAAAAAA	GTTTTACTTA	ATTTTTTTTT	AATTATTTTA	AGGCCAGGCA
961	TGGTAGCATA	TACCTTTAAT	CCCAGCACTG	GGGAGGCAGA	GATAGGCAGA	TCTCTGTGCA
1021	TTTTAGACCA	GCCTGGTCTA	CAGATCTAGT	TCCAGGGCAG	CCAGGGCTAC	ACAAAGAAAC
1081	CCTGTCTTGA	AAAACCAAAC	CAAAAGAAGA	AGAAGGAAGA	GGAGGAGGAA	GAAGAGGAAG
1141	AGAAGGAAGA	AGAAAGAAAG	GAAGAAAGAA	ATTTTATTTT	AGACTTATTT	CATTTTTTGC
1201	ATGTGTTTGT	CTGTGTGTGT	ACCATGGTGC	TTAAATAGAG	TTGGCCAATC	CCCTGGAATC
1261	AGAGTTAGAG	ATGTGGGTGT	TGAGAACTGA	ACTGGGGTCT	TCTTCAAGAG	CAACAAGTAC
1321	TCTTTAACAG	CTGAGCTTTT	TCTCCAGCCC	CCTTTGTTTA	AAAGGTTTCA	TATTAGGTTT
1381	ATTTATTGTC	ATTTTAAAAT	TACATGTGTG	TGTGTGTGTG	GGTGGGGGTA	TGTGCACATG
1441	AGTGCAGTGC	CCTCAGAGGC	CAGAAGGGGG	CATTAGATCC	GCTGAAGCTG	GATTACAGGT
1501	GGTTGTGAAC	AATCGTGTGA	GTTCTGGGAA	CCCGACTCAG	GTCCTTTGAC	AAAACAGCCA
1561	GTGTTCCCTAC	CTACTAAGCC	ATCTCTCTAG	TCACTCTTAC	GTTTGTAGTC	ATCATATGTA
1621	GCCCAGGCTG	GCCTCAAATT	CACTAGGTAC	CTGAGGATGA	CCTTGAATC	ATGACCATCT
1681	TGCCTCCACC	TCCAGAGTGC	TGGGACGGCA	GGTGTGTGTG	CACCTCCACA	CCAGCTTCCC
1741	TTTGTGTCTG	TATACAAATG	CATTTAAGAT	AGAACAACCC	TCAAATGTTA	AAGTTGTTTC
1801	CACAAATCTG	AAGAAGTAAC	AACTCCAAGT	ACCCGTTGTC	CCCGTGTCTG	TATGACAGAC
1861	CATTAAAGAG	CTGTAGAGCC	CAGGTAGGAG	CCTCTGCCAG	CTTCTAAGAG	ATGCAGATGC
1921	AGGGATAGCC	AGTTCAAGGA	TAGCATGGGC	AAAGTAGCAA	TTCTGTCTCG	AAACAGAAAG
1981	AGAGGGCTAA	AGGTGGTCAG	CCATACAGCC	CTGCCTAGAA	TCTCCAAGTG	AGAGGCTGAG
2041	GGCATGGTCA	GGGATGGAGC	CCCTGCCTAG	AGTCCCTCAG	TGAAGAGCAG	GGCCAAGACT
2101	TAAGTGTAGA	GTACCTGACT	AGAACCCCCC	ACTGAGGGTA	GAAGACACGG	CTCAGGGACA
2161	AGCACCTGCT	TAGCATCCCT	GAGGTCAGAA	CTGTGAACGC	ATGGGGGGCA	GTCTTCAGGG
2221	AGAGTCACAG	CCCAGGCCAG	GGACAACTG	AAGCTTGGTG	TGTGTACAGC	AGGACACAGC
2281	AGGCAGGCGA	TCAATGGAGC	GAGAAGCGGG	GTAGGGAGAA	CCCACAAGCA	CCCTTCCCAG
2341	GAGCCTGGCA	CAGCTGCCTC	GGCTGAGGGG	CCCATTGTCC	AGCCACTGCC	TGCACAAGCG
2401	GTTCCATTTT	CTGCATGGGC	CCAGTGCCCC	ATCCCCCTCT	GACTGGGTCA	AGTGAGGACG
2461	TCTGGGATGG	GCTTCCCCCT	CCTCTGCCCT	TTGGGTATTA	TTCCAGTTTC	CCAGGACCCT
2521	GGAACAGACA	ACTCTTGACC	TTGAAGCTCC	ATTGGCCACA	ATGCTGCCCC	TCTGGAGCTT
2581	AGTTTCCCCA	AAAGTGAAGT	GGGCGGTGGT	GTCAGGCTTG	TTCCTGATGT	TGCCTCACAG
2641	AGAATGCCCA	CGTCCTCTGC	CTGAGACTGC	CTTGGGTACT	TCTAATCCCC	CTCAAGTGCT
Exon4						
2701	CGCAGGAGGG	TGGGCAGGAA	GGTTCCAGGG	ACTCCTCCAA	CCATCTGTTG	CAATTGCAGA
2761	ACCACTCGTG	GAGCGAGCTC	TACTCGTTTC	CGCTCTTCAA	GGCCATGAGC	CACATGCTGT
2821	GCATCGGCTA	CGGGCGGCAG	GCGCCCGAGA	GCATGACAGA	CATCTGGCTG	ACCATGCTCA
2881	GCATGATCGT	AGGCGCCACC	TGCTATGCCA	TGTTCAATTG	GCACGCCACT	GCGCTCATCC
(TAC)Y449F (TTC)						
2941	AGTCCCTGGA	TTCGTCACGG	CGCCAAATCC	AGGAGAAGGT	CAGAGGAGGG	AGGCTGTGTC
3001	TTCGGTCTGA	GTGGGGAGGT	GGCCCTGAAT	CTGGGGTGGG	GAAGCAGCCC	CTGGTTCTAA
3061	GGGCTTCTGT	AAGAGCTGAG	GAGAGAGTCA	AAGGGAGGAC	CCAGGTAGGG	GTAGATGAGG
3121	GGAGGGGAGG	AGCCCACCGG	GTTCAGAACC	AACAAGACCA	GTCCCTGGGG	ACCAGTTCTG
3181	AGTGTCTCTG	GGTGTACAGT	TCATGGGGGT	GGTTGAGCAG	CAGAGTGAAC	CTCTGGAGAG
3241	AGCAGAGTTG	CCAGCTATTG	CCATCCCCAG	GACTGGGGAC	AGAGGCAGAT	GCTTTGGGGC
3301	ACACGGCAGC	CAAAAGGGCA	GGAACCTTGG	CTTCAGCAGC	CTGCACCCTT	GCTCTCTGCA
3361	ATGGGTCTCA	GTTCCCCACC	CCCATCAGTG	CCAGCCGGGT	CAGCCGGGCT	CTGTGCCAGG

3421	CCCCCGTCCG	GAAGCCTCCG	TCTCACCCAA	ACATGAGCTG	GTGCTGCCAC	CCACCCGCCG
3481	TCACGGGGTC	CGCTGAGATA	AGGGCAGCTG	TGGCTTGGGC	AGAAATGGGG	CTGGGGCAGC
3541	CCTGGGGTAC	TGTGCTGGGG	ACAGCCTGGC	ACCCACCCCC	CAGCTCTGAT	AGGGAGGGGC
3601	TGGCTCTGTG	TTGGTCCCCA	GGTCCCAGGG	GCAGGGCTGC	GGATGAAAGT	CAACATGCAC
3661	AGTGAGCTTG	GCACTATATA	TAGCCAAGTC	TCAGAAATAG	GAGCCGGACA	CCTAAGGTGC
3721	TCACAGATAC	ACTTTTTTTT	TTTTTCAAGA	CAGGGTTTCT	CTGTGTAGCC	CTGGCTGTCC
3781	TGGAACGCAC	TCTGTAAACC	AGGCTGTCTT	TGAACTCAGA	AAGATCCACC	TGCCTCTGCC
3841	TCCTGAGTGC	TGGGATTAAA	GGCGTGCGCC	ACCACAGCCT	GACTCATAAT	ACACATTTTG
3901	ATAGACATGG	TATCACATAG	CCTAGAATGG	CCTCAAACCT	ATTATATAAC	AGATGACCTT
3961	GCTCCTGACC	TTCCTGCTTA	GTGATGGGGT	TAAAAGTGTA	TCACCACCTG	ATCTAATCTA
4021	GACTTGGGGT	TAAACATAAA	TATATCTGTT	AGCTGGGCAT	GGTGTGTCAG	GCTGTCATCC
4081	TAGCACTTGG	AAAGCTGAGT	TCAAATTCCA	GGTCAGCCTG	AACTACAGAG	TGAGACCCTA
4141	CCACACACAA	TAAAACAAAA	CATGAGGGCC	TGGGGAGGGG	ACTGAGTGAC	TTGCAGTGCT
4201	GGGGGTTGAG	TGACTGCAAG	TGCTGGGGAC	TGAATGACTA	CAGTACTGGG	GACTGAGTGA
4261	CTGTAAGTGC	TGGGGACTGA	GTGACTGCAA	TGCTAGGGGT	TGAGTGAAGT	AAGTGCTGGG
4321	GACTGAGCGA	CTGCAGTGCT	GAGAAATGAG	TGACTGCAAG	TGCTGGGGAC	TGAGTGAAGT
4381	CAAGTGCTGG	AGACTGAGTG	ACTGCATTGC	TGGCTTAGTG	TCCATGAAGA	CCTGGGTTTC
4441	ACTCCAATAT	CATAAACCTT	TTGTGGTGGC	ATTCTCTGTG	CATCCCAGTA	GAGGTAGAGC
4501	TGCAGATCAG	AAATATAAGG	TTATCCTTGG	CTTGTTTGAA	GCCAGCCTGG	GATGAAACTC
4561	TGTCACAAAA	CAAAGCATAT	CATTTGTCTT	TGGTGTGCTG	GGGCTTGGCA	TCCCCCTGGG
4621	CCAGGCTGTG	TAAAGTGTGT	GTCTCTGGGC	TGGGTGGCAT	TAGGGTGGAC	CTGCCTCTGG
Exon5						
4681	TTTGAACACT	GATCCACTTC	TTCTCCCTTC	AGTACAAGCA	AGTAGAGCAA	TACATGTCCT
4741	TCCACAAACT	GCCCCTGAC	TTCCGCCAGA	AGATCCACGA	TTACTATGAA	CACCGGTACC
4801	AAGGGAAGAT	GTTTGATGAG	GACAGCATCC	TTGGGGAAGT	CAACGGGCCA	CTGCGTGAGG
4861	TGAGGGGCCC	ACGGATGGCC	ACAGGACTTG	GGGAGTTTTA	GCCACACCCC	AGCATGCCAC
4921	ACATGCAACT	GTGCCCAGGG	TCCATGGACA	AACTGATGGG	GCATGTGTGG	GACCCGTGGG
4981	ATCAGGTCTG	GCCAGCTGGT	GTAACCCAG	CAGTAGGTGC	TTCTGGGTGT	CACCTGCTCC
5041	ACTGCCAGCT	TCAAACACGA	AACAGTCTGA	AACACACATC	TGTGCGGCCA	TGCTCCCCCC
5101	AAGACCCTCA	GGGAGGGTCC	TTCCTGCATC	TCCTGCCACC	CAGGGACCTT	ACCTATTTCA
5161	TATGTATGGT	GTTTTTTTTT	TAAAGATTT	ATTTATTTAT	TATATGTAAC	TACACTGTAG
5221	CTGTCTTCAG	ACACACCAGA	AGAGGGAGTC	AGATCTCATT	ACGGATGGTT	GTGAGCCACC
5281	ATGTGGTTGC	TGGGATTTGA	ACTCAGGACC	TTTGGAAGAG	CAGTCGAGTG	CTCTTACCTG
5341	CTGAGCCATC	TCACCAGCCC	ATGTGTGGTG	TTTTGCTTGC	ATGTGTGTCT	ATGCACCATG
5401	TACCTGTACA	GGCCAGAAGA	GAATATTGGG	CCCCCTGAAT	CTGGAGTTAC	TGACAGTTGT
5461	GAACCCCAT	GTGGGTGCTG	GGAATCAAAC	CTAGATCCTC	TGGAAAAAAC	AGCCAAAGCT
5521	CTACTGAACC	ATCTCTCCAG	CTCCCCCACC	TCTTAAGATT	TCATTTGATG	TGTGTGAGTG
5581	TGTGTGTGTG	TCCACAAGTG	TGTGCAGATG	CTCACAGAGG	CCAGAAGAGG	GTGTCTGATC
5641	CATTAGAGCT	GGAGTTCCAT	ACACTGTGAG	CCATGGCTGC	TGGGATCCAA	ACCCTGGTCC
5701	TCATGGCTGA	ACAGCAAACA	CTGTCAACCC	AACCCTGTCT	TTAAGTGCAC	ACAAGCATGT
5761	CCCCAGGTGC	ACATGTACAC	GGAGCCAGAA	GACATCCTTG	AGTTTTACCC	GTGAGGGCAC
5821	GGGTACCTTT	CTTTAAGACA	GGGTCTCTTT	TTGGCCTGGA	GCCCAGCCAG	GCATGCTAGC
5881	CATCATACCC	CAAGGACCCT	GTCTCTGCCT	TCCAAGACCT	GGGGTGCCAA	GCATGCGTTG
5941	GCCCCCTCAG	CTTTTCAACA	TGTCTTAAGG	ATGCTTGCGT	GGCTCACAAA	GTGCGTTGAT
6001	CGGTATAACT	CTTCGTTTCC	AGATTTAGTC	CCATTACACAG	CTTCTGGGGC	TCAGGACCTT
6061	GGCCCCAGCC	TTGCCAAGGA	GGTGTGGCCA	GTGACTGGAG	GAACAGTGGT	GTAGTGCTCA
6121	GGGCTGAGTG	TGGGACGGGA	AGGCTGAAGC	AAGAGCATGA	TGTCTAAGTC	CCAGATGGAG
6181	GGCAGGGCCA	GGACAGAGGC	CCCCAGGACT	GAATTACAGG	AGGAGGCTGC	CAGGACCAAG
6241	AGGCCAGGCA	CCTGTGCAGA	GCCTTGGGGA	CTCAGGGCTT	GGGGCCAGG	GCTGTATGGG
6301	GACATCCCAG	TTGGCAGCCT	TTGGTCAATG	ACCTTGGAGA	TATTC AACAG	ACTTCGACTG
6361	TCCCTTTGTA	GAGAACGTAG	CTCACAGGCC	TTGGATGTGT	GAAGTCTACA	GGTTTGTAGG
6421	AGAGGCATGC	ATCTCCACTT	CTGTTACCTT	AGCACCAGCC	CAAAGGAAAC	ATTTCTTTTT
6481	TAAACATTTT	TTTTTCCATT	TTTCACATAT	CCAGTGTTTT	GCCTGAATGT	CTATCTGTGC
6541	CCCACATGCA	TGCAGTGCCA	GCAGCAGCCA	GAAGAGGGCA	TCAGATTCTC	TGGGATTGGA
6601	GTTACAGACT	TCAGTTGTAC	TCAACCAAGT	GCTGCTGGGA	ATTGAAACTA	GGTCTCTGCG
6661	AAGAGTAACT	GTCTCTCCAG	CCATTCTTTT	CCATTTTGA	GTCAAGTTTC	ACTCTACAGA
6721	ACAGGGTGAC	CTCAAAATCA	TGGCAATTCT	CCTGCCTCAG	CCTCCAGGC	CCTTGGCCT
Bcl I EcoR V Afl II XhoI						
6781	GGCTTGGATG	ATCAGATATC	CTTAAGCTCG	AGATCTAGAT	ATCGATGAAT	TCATAACTTC
EcoR I loxP						
ACN-Kassette						
6841	GTATAATGTA	TGCTATACGA	AGTTATGGAT	CTGTCGATCG	ACGGATCGAT	CCGAACAAAC
6901	GACCCAACAC	CCGTGCGTTT	TATTCTGTCT	TTTTATTGCC	GATCCCCTCA	GAAGAACTCG
6961	TCAAGAAGGC	GATAGAAGGC	GATGCGCTGC	GAATCGGGAG	CGGCATACC	GTAAAGCACG

7021	AGGAAGCGGT	CAGCCCATT	GCCGCCAAGC	TCTTCAGCAA	TATCACGGGT	AGCCAACGCT
7081	ATGTCCTGAT	AGCGGTCCGC	CACACCCAGC	CGGCCACAGT	CGATGAATCC	AGAAAAGCGG
7141	CCATTTTCCA	CCATGATATT	CGGCAAGCAG	GCATCGCCAT	GGGTACACGAC	GAGATCCTCG
7201	CCGTCGGGCA	TGCGCGCCTT	GAGCCTGGCG	AACAGTTTCGG	CTGGCGCGAG	CCCCTGATGC
7261	TCTTCGTCCA	GATCATCCTG	ATCGACAAGA	CCGGCTTCCA	TCCGAGTACG	TGCTCGCTCG
7321	ATGCGATGTT	TCGCTTGGTG	GTCGAATGGG	CAGGTAGCCG	GATCAAGCGT	ATGCAGCCGC
7381	CGCATTGCAT	CAGCCATGAT	GGATACTTTC	TCGGCAGGAG	CAAGGTGAGA	TGACAGGAGA
7441	TCCTGCCCCG	GCACTTCGCC	CAATAGCAGC	CAGTCCCTTC	CCGCTTCAGT	GACAACGTCG
7501	AGCACAGCTG	CGCAAGGAAC	GCCCGTTCGT	GCCAGCCACG	ATAGCCGCGC	TGCCTCGTCC
7561	TGCAGTTTAT	TCAGGGCACC	GGACAGGTCG	GTCTTGACAA	AAAGAACCAG	GCGCCCCCTG
7621	GCTGACAGCC	GGAACACGGC	GGCATCAGAG	CAGCCGATTG	TCTGTTGTGC	CCAGTCATAG
7681	CCGAATAGCC	TCTCCACCCA	AGCGGCCGGA	GAACCTGCGT	GCAATCCATC	TTGTTCAATG
7741	GCCGATCCCA	TATTGGCTGC	ACGGATCCTG	AACGGCAGAG	GTTACGGCAG	TTTGTCTCTC
7801	CCCCTTCCGG	GAGCCACCTT	CTTCTCCAAC	CGTCCCCTTC	GCGCTCTCGG	CGCTTCTGAG
7861	GAGAGAACTG	GCTGAGTGAC	GCCCTTTATA	GATTCGCCCT	TGTGTCCCGC	CCCTTCCTTT
7921	CCCGCCCTCC	CTTGCGCTAC	GGGGCCGCC	GCACCGGCCT	ACACGGAGCG	GCGCGGGCGG
7981	AGTTGTTGAC	GCTAGGGCTC	CGGCTCCCTG	GTTGGGTGTT	CTTTCTGACG	CGACAGGAGG
8041	AGGAGAATGT	TCCTGGTCCT	GTCGTCCTCC	TTTCGGGTTT	CCCGTGCCTC	CAAACCGAGG
8101	ACTTACAGAA	CGGAGGATAA	AGTTAGGCCA	TTTTTACTCA	GCTTCGGAGT	TCAGGCTCAT
8161	TTTCAGCTAA	AGTCTCTCAT	TAGTATCCCC	CCACACACAT	CGGGAAAATG	GTTTGTCTTA
8221	CGCATCGGTA	ATGAAGGCGG	GGCCCTTCGG	GTCCTCCGGA	GCGGGTTCCG	GGGGTGGGGG
8281	GAAGGAGGGA	GGGACGGGAC	GGGCCTCGTT	CATGAATATT	CAGTTCACCG	CTGAATATGC
8341	ATAAGGCAGG	CAAGATGGCG	CGTCCAATCA	ATTGGAAGTA	GCCGTTATTA	GTGGAGAGGC
8401	CCCAGGACGT	TGGGGCACCG	CCTGTGCTCT	AGTAGCTTTA	CGGAGCCCTG	GCGCTCGATG
8461	TTCAGCCCAA	GCTTTCGCGA	GCTCGACCGA	ACAAACGACC	CAACACCCGT	GCGTTTTATT
8521	CTGTCTTTTT	ATTGCCGCTC	AGCTTTACAG	TGACAATGAC	GGCTGGCGAC	TGAATATTAG
8581	CTGTTACAGA	CAGCACTACA	TATTTTCCGT	CGATGTTGAA	ATCCTTTCTC	ATATGTCAAC
8641	ATAAATATCA	AATAATTATA	GCAATCATTT	ACGCGTTAAT	GGCTAATCGC	CATCTTCCAG
8701	CAGGCGCACC	ATTGCCCTCG	TTTCACTATC	CAGGTTACGG	ATATAGTTCA	TGACAATATT
8761	TACATTGGTC	CAGCCACCAG	CTTGCATGAT	CTCCGGTATT	GAAACTCCAG	GCGGGGCCAT
8821	ATCTCGCGCG	GCTCCGACAC	GGGCACTGTG	TCCAGACCAG	GCCAGGTATC	TCTGACCAGA
8881	GTCATCCTAA	AATACACAAA	CAATTAGAAT	CAGTAGTTTA	ACACATTATA	CACTTAAAAA
8941	TTTTATATTT	ACCTTAGCGC	CGTAAATCAA	TCGATGAGTT	GCTTCAAAAA	TCCCTTCCAG
9001	GGCGCGAGTT	GATAGCTGGC	TGGTGGCAGA	TGGCGCGGCA	ACACCATTTT	TTCTGACCCG
9061	GCAAAACAGG	TAGTTATTTC	GATCATCAGC	TACACCAGAG	ACGGAAATCC	ATCGCTCGAC
9121	CAGTTTAGTT	ACCCCCAGGC	TAAGTGCCCT	CTCTACACCT	GCGGTGCTAA	CCAGCGTTTT
9181	CGTTCTGCCA	ATATGGATTA	ACATTCTCCC	ACCGTCAGTA	CGTGAGATAT	CTTTAACCCCT
9241	GATCCTGGCA	ATTTTCGGCTA	TACGTAACAG	GGTGTTATAA	GCAATCCCCA	GAAATGCCAG
9301	ATTACGTATA	TCCTGGCAGC	GATCGCTATT	TTCCATGAGT	GAACGAACCT	GGTCGAAATC
9361	AGTGCGTTTC	AACGCTAGAG	CCTGTTTTGC	ACGTTACACG	GCATCAACGT	TTTCTTTTCG
9421	GATCCGCCGC	ATAACCAGTG	AAACAGCATT	GCTGTCACTT	GGTCGTGGCA	GCCCGGACCG
9481	ACGATGAAGC	ATGTTTAGCT	GGCCCCAATG	TTGCTGGATA	GTTTTTACTG	CCAGACCGCG
9541	CGCCTGAAGA	TATAGAAGAT	AATCGCAAGC	ATCTTCAGGT	TCTGCGGGAA	ACCATTTCGG
9601	GTTATTCAAC	TTGCACCATG	CCGCCACAGA	CCGGCAAACG	GACAGAAAGC	TTTTCCAGGT
9661	ATGCTCAGAA	AACGCCTGGC	GATCCCTGAA	CATGTCCATC	AGGTTCCTGC	GAACCTCATC
9721	ACTCGTTGCA	TCGACCGGTA	ATGCAGGCAA	ATTTTGGTGT	ACGGTCAGTA	AATTGGACAC
9781	CTTCCTCTTC	TTCTTGGGCA	TGGCCGCGAG	AAAGCAGAGC	CCTGAAGCTC	CCATCACCGG
9841	CCAATAAGAG	CCAAGCCTGC	AGTGTGACCT	CATAGAGCAA	TGTGCCAGCC	AGCCTGACCC
9901	CAAGGGCCCT	CAGGCTTGGG	CACACTGTCT	CTAGGACCCT	GAGAGAAAGA	CATACCCATT
9961	TCTGCTTAGG	GCCCTGAGGA	TGAGCCAGG	GGTGGCTTGG	CACTGAAGCA	AAGGACACTG
10021	GGGCTCAGCT	GGCAGCAAAG	TGACCAGGAT	GCTGAGGCTT	TGACCCAGAA	GCCAGAGGCC
10081	AGAGGCCAGG	ACTTCTCTTG	GTCCAGTCC	ACCCTCACTC	AGAGCTTTAC	CAATGCCCTC
10141	TGGATAGTTG	TCGGGTAACG	GTGGACGCCA	CTGATTCTCT	GGCCAGCCTA	GGACTTCGCC
10201	ATTCCGCTGA	TTCTGCTCTT	CCAGCCACTG	GCTGACCGGT	TGGAAGTACT	CCAGCAGTGC
10261	CTTGGCATCC	AGGGCATCTG	AGCCTACCAG	GTCCTTCAGT	ACCTCCTGCC	AGGGCCTGGA
10321	GCAGCCAGCC	TGCAACACCT	GCCTGCCAAG	CAGAGTGACC	ACTGTGGGCA	CAGGGGACAC
10381	AGGGTGGGGG	CCACAACAGC	ACCATTGTCC	ACTTGTCCCT	CACTAGTAAA	AGAACTCTAG
10441	GGTTGCGGGG	GTTGGGGGAG	GTCTCTGTGA	GGCTGGTAAG	GGATATTTGC	CTGGCCCATG
10501	GAGATCC	ATA ACTTCGTATA	ATGTATGCTA	TACGAAGTTA	TAAGCTTTTCG	CGAGCTCGAG
10561	GAATTCGGAT	CCCGCGGGTG	ATCAATTTTTT	GTGTGTCCCT	CTGACTCCCT	CCCCCTTGGG
10621	AGGGCCTGAG	CTCACAGCCC	TGTAGTGAAT	CAAGGAGGCT	GGTCTCATTG	TGCACGTGTG

ACN-Kassette

loxP

Xho I

EcoR I

BamH I

SacI I

Bcl I

10681	CCTTGTTGGC	TTCTGCATAT	GCCCTTGGCA	GTGACCGTGA	CTAGATGTTG	CTGCTTAGAC
10741	AACACAAGCA	TGATGTGTCC	TGGCGGGAAC	GACATTGGAT	AAATGTAGCA	GAGAGAGAGA
10801	AAGGATGCCC	TGGCGAAGAG	GCCCCAGGAC	GCACGTGGAG	TGGCCTTCTT	TCTCTTTAGA
10861	AGTGCTTTGT	TATGAGACAG	GAGCTCATGC	AGCTCAGGAT	GTCCTGGACT	GTCACTATAT
10921	AGGTGATGAG	GGTGACCTTG	AACTCCTGAT	CCTCCTGCCT	TCGCCTCCAG	AGGGCTGTGA
10981	TGGTCGATAG	GCTCGAGTGA	CCTGGCTTAT	GCCATGCTGG	GGATGGAAC	CAGGGCACGC
11041	CAGGGAAGAG	CTGAGCTCTG	GCCTCTCCTT	TAATTCCTTT	GGGTATTTTT	TTGTGGTCCT
11101	GTCACCTTAT	CTTTAGCTAT	AATGGCTTTC	TCCAGTTCAG	TGTCACATCAT	CCTATGGTGG
11161	TATGGGGACT	ACAGACTTTC	CTGTATACCT	AAAGTTCATC	TGGTCCTGCC	TCCAGCGTCC
11221	GCCTGGGAAG	TTAGATAGGG	GCTGAGGGTT	CACCAAGTAG	CCAGAGGAA	AGTGGGGGTC
Exon6						
11281	TGAGTTACCA	AGCCAGTCAC	TGAGCCACCC	TCCCTCCCAC	CCACAGGAGA	TTGTGAACCT
11341	CAACTGCCGG	AAGCTGGTGG	CTTCCATGCC	GCTGTTTGCC	AATGCAGACC	CCAACCTTCGT
11401	CACAGCCATG	CTGACAAAGC	TCAAATTTGA	GGTCTTCCAG	CCTGGAGATT	ACATCATCCG
11461	AGAGGGGACC	ATCGGGAAGA	AGATGTACTT	CATCCAGCAT	GGGGTGGTGA	GCGTGCTCAC
11521	CAAGGGCAAC	AAGGAGATGA	AGCTGTCTGG	TGGCTCCTAT	TTCGGGG	GTG AGCACCCCTGT
11581	GGCAAGGCTG	AGATCTGGAT	GGGATGGGAC	CTGGGGAGGT	CCCAGGAGGG	TTTGACCCAG
11641	CAGCAGGCCA	GCTCTGAGCA	TGTGCTGGGC	AGGCAGTGGC	ATAGTTTGGC	TGCTGAGGCA
Exon7						
11701	CCACCCTTGT	TTTCACAGAG	ATCTGCTTGC	TCACGAGGGG	CCGGGAAGCG	GCCAGCGTGC
11761	GAGCTGACAC	CTACTGTCTG	CTCTACTCAC	TGAGTGTGGA	CAATTTCAAC	GAGGTGCTGG
11821	AGGAATACCC	CATGATGCGG	CGTGCTTTTG	AGACTGTGGC	TATTGACCGG	CTAGATCGCA
11881	TAGGTGAGCT	GCTGCCATCT	GTCCAGGAGG	GATCGGGGAA	GTAGAGGCAT	GGCATGGCAT
11941	ATGCTCAGGG	GTGTCCAGAG	GACACAGGGG	AAGGTGTCTT	CCTGGACCGA	GCATGGCAGG
12001	CAAAGCCTGG	GGTGAAAAGG	AAGGTCGGGA	GAACCGAGGC	AATAAAGGCC	AGAATCACAG
12061	GGCCTGGTGA	GAACGGCTCA	GGCTCAATAA	ACCAGGCACA	TTAGGGGTGT	GGAGTATTCT
12121	AGGTTTGTGG	GGCAACATCT	GAAAGGAGGC	TGGAGGCCTG	TCGGGCAGGG	AGGGGTGGGG
12181	CCCTTGCTGA	TGACAGGATA	TAGAGATCAG	ATGTGAAGAC	TGTGGCTCCA	TTCCAGTGGG
12241	GCAGGATGGG	TCGGAGGGCA	TATGCCCGCA	CACAACAGGC	ACTCTATACA	GAATATGGTG
12301	GGTATTTATC	TGTACCTGCT	GTATACAGCA	GGCATTTTCA	ATGCACTTGC	TACAGAACAA
12361	GCACTCAGTA	CTTGGAATTT	ACCTTGGGTG	CTGAGAACAT	GCCTGCTGCA	TGCAGTATGA
12421	GCTGGCTGTA	CACAGTAGGT	GCTGCACTCA	TGCTTATTAG	GTAGGCAGGT	GCTCAAGCTA
Exon8						
12481	GCGCTGACAG	CCTCCCTAAC	CCCCTGCCCA	CAGGCAAGAA	GAAGTCCATC	TTGCTGCACA
12541	AGGTTTCAAG	TGATCTCAGC	TCAGGTGTGT	TCAACAACCA	GGAGAATGCC	ATCATCCAGG
12601	AGATTGTCAA	ATATGACCGT	GAGATGGTGC	AGCAGGCAGA	GCTTGGCCAG	CGTGTGGGGC
12661	TCTTCCCAAC	ACCGCCACCA	CCGCAGGTCA	CATCGGCCAT	TGCCACCCTA	CAGCAGGCTG
12721	TGGCCATGAG	CTTCTGCCCC	CAGGTGGCCC	GCCCCTCGT	GGGGCCCCCTG	GCGCTAGGCT
12781	CCCCACGCCT	AGTGCGCCGC	GCGCCCCCAG	GGCCTCTGCC	TCCTGCAGCC	TCGCCAGGGC
12841	CACCCGCAGC	AAGCCCCCCG	GCTGCACCCCT	CGAGCCCTCG	GGCACCCCGG	ACCTCACCCCT
12901	ACGGTGTGCC	TGGCTCTCCG	GCAACGCGTG	TGGGGCCCCG	ATTGCCCGCA	CGTCGCCTGA
12961	GCCGCGCCTC	GCGCCCACTG	TCCGCTCGC	AGCCCTCGCT	GCCCCATGGC	GTGCCCGCGC
13021	CCAGCCCCGC	GGCCTCTGCG	CGCCCGGCCA	GCAGCTCCAC	GCCGCGCCTG	GGACCCGCAC
13081	CCACCGCCCC	GACCGCCGCG	CCCAGTCCGG	ACCGCAGGGA	CTCAGCCTCG	CCGGGCGCTG
3'UTR						
13141	CCAGTGGCCT	CGACCCACTG	GACTCTGCGC	GCTCGCGCCT	CTCTTCCAAC	TTGTGACCTT
13201	TGAGCGCCGC	CCCGCGGGCC	GGGCGGGGCC	GTCATCCACA	CCAAAGCCAT	GCCTCGCGCC
13261	GCCCCGCCGT	GCCCCGTGCA	AAGCCATAGA	GGGACGTAGG	TAGCTTAGGA	GGCGGGCGGC
13321	CCTGCGCCCC	GCTGTCCCCC	CATCGCCCTG	CGCCACCCCT	CATCGCCCTT	GCCCCAGCGG
13381	CGGCCGCACG	GGAGAGGGAG	GGGTGCGATC	ACCTCGGTGC	CTCAGCCCCA	ACCTGGGACA
13441	GGGACAGGGC	GGCCCTGGCC	GAGGACCTGG	CTGTGCCCCG	CATGTGCGGT	GGCCTCCGAG
13501	GAAGAATATG	GATCAAGTGC	AATACTCGGC	CCGCCGGCTT	CCCGCTGCCC	CTGGCAAGCT
13561	CACGCAATAA	CCAGCCCGCC	CCTGCCACAG	CGTCCGTGGT	GACCTCCCTC	GGGCACCCAG
13621	GGGCGGGCTT	CACGGCCAAG	CCGGCGTGGG	GGTGAGGCTG	GGTCCCCGCC	GTCGCCATGA
13681	ATGTACTGAC	GAGCCGAGGC	AGCAGTGGCC	CCCACGCCCC	ATTAACCCAC	AACCCCATTC
13741	CGCGCAATAA	ACGACAGCAT	TGGCGCCGAG	CGCAGCGTCT	CATTACTTTG	GTGGGTTTGC
13801	GCACCGCCAG	AAAGTGCGCG	CTGGCATAGG	TAGACACAAA	CTTTCATTTA	TTTACATTAT
13861	GCACAGGTTT	AGGGACCGCA	TGGCTGTGGT	CAGCTGAAAA	AGTAGGTGGA	TCTTATCACC
13921	TGTCCTAGAT	CGAAGGTACC	TGTAAGGCCA	AGAGTGCAGA	ACTAGGCTCG	GGCCACTGAT
13981	TCATCTCAA	GGCCAGCGTG	CATGTCCCCC	TTAAATCCTT	ACCTGTCTTT	GGCAAGGACT
14041	GTAGTGTCTC	CTGCAGCTTG	GTGACCAGGG	CGCGCTCCGA	GGACTTTAGG	GACTTGATGC
14101	TGCAAACAGG	TTAGGGTAGA	CATCAGTGCG	GCAGCAGGTG	GCAGGCAGGG	CACCAGGCCA
14161	CAAGAGGGGG	TATCTCACCT	GGACACGGAG	CAGAAACGCT	TCTTCAGGAA	CTTGCCAGG
14221	TCTTCCAGGA	TGGGCTGGCT	GTGCAGGCGC	ACGAATTGCT	CGCGGCATAC	CTGAGGGGTT

14281	GCAGGCTCGG	AGTCAGCCAT	GGTACAAATT	CCCAGGATCA	AGGCCCCATT	TTCTACTTGT
14341	GGGGTCACGG	GGGGGGGGGG	GGGGGCGGGA	CGGGACGGAC	GGGACACACC	TCGTTTCATCG
14401	TGGGGATGTC	AGCGGCATGT	GTCCAGAAGC	AGTCGTGCAC	GGAGACGAAA	ATCAGGCCCT
14461	TCCTGAGCAG	GGAGATCCCG	AGTGAGATAG	CTAGTTGCTT	GGCCAGCTAC	TGCCTGAACC
14521	TCGTCTGACA	GATATCCTGT	CATCTGCCCC	AGCACTGGGC	ACTCTGCCAG	GGTTCCTTGG
14581	ACACCTTTGG	TTCCCCAGTG	CTCTAGGTAG	TAGATGTTCA	AGAAGATGGC	TTACATTCCC
14641	TCAAACAGCT	GCGGGGTCTT	GGAGTAAAGG	GAAGCCCCTG	TCTGCACCAA	GGACTCCCGC
14701	AACTTTCCAG	CAGTGCCTCC	ATCCTGTCTT	GCCCCTCATC	ATGGGGGTAC	C GGCGCGCG G
	<p> Targeting Konstrukt HCN2-FEA ← Asc I pBlueskript Vektor </p>					
14761	CGCGCTTGGC	GTAATCATGG	TCATAGCTGT	TTCCTGTGTG	AAATTGTTAT	CCGCTCACAA
14821	TTCCACACAA	CATACGAGCC	GGAAGCATAA	AGTGTAAGC	CTGGGGTGCC	TAATGAGTGA
14881	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	TGCCCCGCTT	CCAGTCGGGA	AACCTGTCTG
14941	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG	CGGTTTGCGT	ATTGGGCGCT
15001	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	GACTCGCTGC	GCTCGGTCTG	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT
15061	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA
15121	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT
15181	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT
15241	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC	AGGCGTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC
15301	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTTTCT	CCTTCGGGAA
15361	GCGTGGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	GTCGTTCTCG
15421	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG	TTCAGCCCCG	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA
15481	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAGAC	ACGACTTATC	GCCACTGGCA	GCAGCCACTG
15541	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	GCGGTGCTAC	AGAGTTCTTG	AAGTGGTGGC
15601	CTAACTACGG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA
15661	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG
15721	GTTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT
15781	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	GGAACGAAAA	CTCACGTTAA	GGGATTTTTG
15841	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	ATCTTCACCT	AGATCCTTTT	AAATTAAAAA	TGAAGTTTTA
15901	AATCAATCTA	AAGTATATAT	GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG
15961	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGTCTATTTT	GTTTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCT
16021	TGTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC	CAGTGCTGCA	ATGATACCGC
16081	GAGACCCACG	CTCACC GGCT	CCAGATTTAT	CAGCAATAAA	CCAGCCAGCC	GGAAGGGCCG
16141	AGCGCAGAAG	TGGTCCTGCA	ACTTTATCCG	CCTCCATCCA	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG
16201	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTTC	CCAGTTAATA	GTTTGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTACAG
16261	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	TCGTTTGGTA	TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT
16321	CAAGGCGAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT	GCAAAAAAGC	GGTTAGCTCC	TTCGGTCCCT
16381	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	TTGGCCGCAG	TGTTATCACT	CATGGTTATG	GCAGCACTGC
16441	ATAATTCTCT	TACTGTCATG	CCATCCGTAA	GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA
16501	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG	TGTATGCGGC	GACCGAGTTG	CTCTTGCCCG	GCGTCAATAC
16561	GGGATAATAC	CGCGCCACAT	AGCAGAACTT	TAAAAGTGCT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT
16621	CGGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	ATCTTACCGC	TGTTGAGATC	CAGTTCGATG	TAACCCACTC
16681	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	GCATCTTTTA	CTTTCACCA	CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA
16741	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	AAAAAGGGAA	TAAGGGCGAC	ACGGAAATGT	TGAATACTCA
16801	TACTCTTCCT	TTTTCAATAT	TATTGAAGCA	TTTATCAGGG	TTATTGTCTC	ATGAGCGGAT
16861	ACATATTTGA	ATGTATTTAG	AAAAATAAAC	AAATAGGGGT	TCCGCGCACA	TTTCCCCGAA
16921	AAGTGCCAC					

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Eckert C. (2006), „In vitro- und in vivo-Untersuchungen zur Regulation von HCN-Kanälen durch Tyrosinphosphorylierung und zyklische Nukleotide“ Dissertation an der LMU
- Much B. (2003), „Untersuchung zur Heteromerisierung, Funktion und genetischen Struktur von HCN Schrittmacherkanälen“ Dissertation an der LMU
- Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D. 2003. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 549(Pt 2):347-359.
- Bal T, McCormick DA. 1996. What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* 17(2):297-308.
- Bal T, McCormick DA. 1997. Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I(h). *J Neurophysiol* 77(6):3145-3156.
- Bal T, von Krosigk M, McCormick DA. 1995a. Role of the ferret perigeniculate nucleus in the generation of synchronized oscillations in vitro. *J Physiol* 483 (Pt 3):665-685.
- Bal T, von Krosigk M, McCormick DA. 1995b. Synaptic and membrane mechanisms underlying synchronized oscillations in the ferret lateral geniculate nucleus in vitro. *J Physiol* 483 (Pt 3):641-663.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89(3):847-885.
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. 1979a. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280(5719):235-236.
- Brown HF, DiFrancisco D, Noble SJ. 1979b. Adrenaline action on rabbit sino-atrial node [proceedings]. *J Physiol* 290(2):31P-32P.
- Brown HF, Giles W, Noble SJ. 1977. Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus. *J Physiol* 271(3):783-816.
- Budde T, Caputi L, Kanyshkova T, Staak R, Abrahamczik C, Munsch T, Pape HC. 2005. Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. *J Neurosci* 25(43):9871-9882.
- Bunting M, Bernstein KE, Greer JM, Capecchi MR, Thomas KR. 1999. Targeting genes for self-excision in the germ line. *Genes Dev* 13(12):1524-1528.
- Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC. 2000. Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J Biol Chem* 275(46):36465-36471.
- Craven KB, Zagotta WN. 2004. Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels. *J Gen Physiol* 124(6):663-677.
- Crunelli V, Kelly JS, Leresche N, Pirchio M. 1987. The ventral and dorsal lateral geniculate nucleus of the rat: intracellular recordings in vitro. *J Physiol* 384:587-601.
- Decher N, Chen J, Sanguinetti MC. 2004. Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers. *J Biol Chem* 279(14):13859-13865.
- DiFrancesco D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 55:455-472.

- DiFrancesco D, Ducouret P, Robinson RB. 1989. Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* 243(4891):669-671.
- DiFrancesco D, Tortora P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351(6322):145-147.
- DiFrancesco D, Tromba C. 1988a. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 405:477-491.
- DiFrancesco D, Tromba C. 1988b. Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 405:493-510.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280(5360):69-77.
- Emery EC, Young GT, Berrocoso EM, Chen L, McNaughton PA. 2011. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science* 333(6048):1462-1466.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-156.
- Fain GL, Quandt FN, Bastian BL, Gerschenfeld HM. 1978. Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272(5652):466-469.
- Fuentealba P, Timofeev I, Steriade M. 2004. Prolonged hyperpolarizing potentials precede spindle oscillations in the thalamic reticular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9816-9821.
- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393(6685):583-587.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265(5168):103-106.
- Guillery RW, Sherman SM. 2002. Thalamic relay functions and their role in corticocortical communication: generalizations from the visual system. *Neuron* 33(2):163-175.
- Halliwel JV, Adams PR. 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250(1):71-92.
- Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL. 1995. Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 269(5224):679-682.
- Hirsch JC, Fourment A, Marc ME. 1983. Sleep-related variations of membrane potential in the lateral geniculate body relay neurons of the cat. *Brain Res* 259(2):308-312.
- Huang Z, Lujan R, Kadurin I, Uebele VN, Renger JJ, Dolphin AC, Shah MM. 2011. Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci* 14(4):478-486.
- Jahnsen H, Llinas R. 1984a. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. *J Physiol* 349:205-226.
- Jahnsen H, Llinas R. 1984b. Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *J Physiol* 349:227-247.
- Keller EB, Noon WA. 1984. Intron splicing: a conserved internal signal in introns of animal pre-mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(23):7417-7420.
- Kusch J, Biskup C, Thon S, Schulz E, Nache V, Zimmer T, Schwede F, Benndorf K. 2010. Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron* 67(1):75-85.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. 2005. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309(5736):903-908.
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel

- M, Hofmann F. 2003. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo J* 22(2):216-224.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393(6685):587-591.
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. 1999. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *Embo J* 18(9):2323-2329.
- Lüthi A, McCormick DA. 1998. Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca^{2+} -mediated upregulation of Ih. *Neuron* 20(3):553-563.
- Lüthi A, McCormick DA. 1999. Modulation of a pacemaker current through Ca^{2+} -induced stimulation of cAMP production. *Nat Neurosci* 2(7):634-641.
- Magee JC. 1998. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 18(19):7613-7624.
- Magee JC. 1999. Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* 2(9):848.
- Mangoni ME, Nargeot J. 2008. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88(3):919-982.
- Männikkö R, Elinder F, Larsson HP. 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* 419(6909):837-841.
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336(6197):348-352.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7634-7638.
- Matt L, Michalakakis S, Hofmann F, Hammelmann V, Ludwig A, Biel M, Kleppisch T. 2011. HCN2 channels in local inhibitory interneurons constrain LTP in the hippocampal direct perforant path. *Cell Mol Life Sci* 68(1):125-137.
- McCormick DA, Bal T. 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 20:185-215.
- McCormick DA, Feuser HR. 1990. Functional implications of burst firing and single spike activity in lateral geniculate relay neurons. *Neuroscience* 39(1):103-113.
- McCormick DA, Pape HC. 1988. Acetylcholine inhibits identified interneurons in the cat lateral geniculate nucleus. *Nature* 334(6179):246-248.
- McCormick DA, Pape HC. 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431:291-318.
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 1999. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380(7-8):975-980.
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M. 2003. Role of Subunit Heteromerization and N-Linked Glycosylation in the Formation of Functional Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels. *J Biol Chem* 278(44):43781-43786.
- Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsaki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. 2004. A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 119(5):719-732.
- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. 2003. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* 115(5):551-564.

- Noma A. 1976. Mechanisms underlying cessation of rabbit sinoatrial node pacemaker activity in high potassium solutions. *Jpn J Physiol* 26(6):619-630.
- Notomi T, Shigemoto R. 2004. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471(3):241-276.
- Orban PC, Chui D, Marth JD. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15):6861-6865.
- Prole DL, Yellen G. 2006. Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J Gen Physiol* 128(3):273-282.
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F. 1996. Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98(3):600-603.
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA. 2000. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20(14):5264-5275.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR. 1998. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93(5):717-729.
- Sartiani L, De Paoli P, Stillitano F, Aimond F, Vassort G, Mugelli A, Cerbai E. 2006. Functional remodeling in post-myocardial infarcted rats: focus on beta-adrenoceptor subtypes. *J Mol Cell Cardiol* 40(2):258-266.
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. 1999. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16):9391-9396.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317(6034):230-234.
- Steriade M, Deschenes M. 1984. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res* 320(1):1-63.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262(5134):679-685.
- Steriade M, Timofeev I. 2003. Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron* 37(4):563-576.
- Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. 2004. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med* 14(1):23-28.
- Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem* 280(41):34635-34643.
- Talts JF, Brakebusch C, Fassler R. 1999. Integrin gene targeting. *Methods Mol Biol* 129:153-187.
- Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51(3):503-512.
- Timofeev I, Contreras D, Steriade M. 1996. Synaptic responsiveness of cortical and thalamic neurones during various phases of slow sleep oscillation in cat. *J Physiol* 494 (Pt 1):265-278.
- Tsay D, Dudman JT, Siegelbaum SA. 2007. HCN1 Channels Constrain Synaptically Evoked Ca(2+) Spikes in Distal Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* 56(6):1076-1089.
- Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M. 2000. Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett* 479(1-2):35-40.
- Viscomi C, Altomare C, Bucci A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D. 2001. C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 276(32):29930-29934.

- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411(6839):805-810.
- Wang J, Chen S, Siegelbaum SA. 2001. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol* 118(3):237-250.
- Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A, Vijayraghavan S, Brennan A, Dudley A, Nou E, Mazer JA, McCormick DA, Arnsten AF. 2007. Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129(2):397-410.
- Wang Y, Schnegelsberg PN, Dausman J, Jaenisch R. 1996. Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature* 379(6568):823-825.
- Williams SR, Stuart GJ. 2000. Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83(5):3177-3182.
- Yu FH, Catterall WA. 2004. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* 2004(253):re15.
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425(6954):200-205.
- Zhou L, Siegelbaum SA. 2007. Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy. *Structure* 15(6):655-670.
- Zhou L, Siegelbaum SA. 2008. Pathway and endpoint free energy calculations for cyclic nucleotide binding in HCN channel. *Biophys J*.

8. PUBLIKATIONEN

Zong X, Schieder M, Cuny H, Fenske S, **Gruner C**, Rötzer K, Griesbeck O, Harz H, Biel M, Wahl-Schott C. The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca(2+)-release from lysosomal stores. Pflügers Arch. 2009 Sep; 458(5):891-9. Epub 2009 Jun 26.